

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular (Morfología Microscópica)



**REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE LA
METALOPROTEINASA DE MATRIZ (MMP-9) EN
LA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA-B Y SU
PAPEL EN LA PATOGÉNESIS DE LA
ENFERMEDAD.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Javier Redondo Muñoz

Bajo la dirección de la doctora

M^a de los Ángeles García Pardo

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-8003-1

© Javier Redondo Muñoz, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE LA
METALOPROTEINASA DE MATRIZ (MMP-9)
EN LA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA-B
Y SU PAPEL EN LA PATOGÉNESIS DE LA
ENFERMEDAD**

TESIS DOCTORAL

JAVIER REDONDO MUÑOZ

2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE LA
METALOPROTEINASA DE MATRIZ (MMP-9)
EN LA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA-B
Y SU PAPEL EN LA PATOGÉNESIS DE LA
ENFERMEDAD**

Este trabajo ha sido realizado por **Javier Redondo Muñoz** para optar al grado de Doctor, en el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid (CSIC), bajo la dirección de la Dra. M^a de los Ángeles García Pardo.

Fdo: Dra. M^a de los Ángeles García Pardo.



*Ciencia es aquello sobre lo cual
cabe siempre discusión.*
José Ortega y Gasset

AGRADECIMIENTOS

¡Ya está! Después de estos años en el laboratorio llego a la meta y puedo dar las gracias a las personas que me han acompañado en este camino. Espero no dejarme a nadie en el tintero, y en caso de olvido pido perdón por anticipado.

En primer lugar, y como no puede ser de otra manera, quiero darle las gracias a Geli por haberme dado la oportunidad de trabajar, desarrollar mi vocación investigadora, y hacer la tesis en su laboratorio. Gracias por confiar en mí y fomentar mi espíritu científico. Por tus críticas, por preocuparte por mí, por tu apoyo, reuniones, congresos y artículos. En definitiva, gracias porque no hubiera podido tener mejor directora de tesis.

Mil gracias a la gente con la que he compartido estos años. A todo “mi” laboratorio al cual debería dedicar no un párrafo, sino cuatro hojas enteras. A Mercedes (una segunda madre en el laboratorio ¡y pensar que entré con 22 años...!), a Alfred (compañero, confidente y amigo, gracias por seguir haciendo equipo aunque no estés), a Ely (el apoyo musical y cinéfilo del labo) y a Estefi (adelante sucesora que tú puedes con todo).

A todo el pasillo con el que he compartido momentos increíbles. Gracias a todos los jefes por tener un momento para mí cuando tenía alguna duda, y a todos vosotros por compartir gymkhanas, cumpleaños, cañas, dudas científicas y no científicas: al grupo de Santiago (Jorge, Goico, Olga, Tamara, Rubén, Sheila, Agustín, Sonia, Ohiane y Sarita), al de Tito y José Alberto (Alex, Paloma, Walter, Leyre, Nacho, Eli, Carmen, Eva, Rolando, Gemma y Mari Ángeles), al de Joaquín (David, Marisa, Sotillo, Isa, Rubén, Georgina, Pablo, Noemí, Ana D y Ana S), a la gente con la que he charlado del grupo de Ángel (Laura, Elena S.) y José Luis (Cris, Lorena y Cristi). También tengo que incluir aquí al trío de cracks de Jesús del Mazo (David, Jesús y Sergio).

Gracias también a toda la gente del CIB con la que he estado descansando de blots, mientras nos tomábamos algo en Campus o La Camocha para terminar un Jueves y comenzar un Viernes. El compartir pasillo, cenas, risas,... marcaron una época de mi vida: a los FdPs (Gaizka, Jimena, Silvia, Óscar, Tere y Mariam) a los Rubenes (Blas y Juan), a las chicas de Luisa Botella (Afri y Eva) a Asier, Ángela, Bibi, Raquel, Úrsula, Sonia, Emilio, Checho, Carmen, Rodri... La mayoría emigrasteis ya o dejasteis la ciencia pero no sin antes haberos hecho un hueco en mi memoria. También gracias al resto de gente y servicios del CIB: citometría (especialmente a Pedro), cocinas, confocal, servicio técnico, la gente del control, seguridad, etc.

No puedo olvidarme de la gente que conozco de otros centros o antiguos compañeros de carrera. A Paloma y todo su grupo (Rafa y Ana, especialmente). Desde la primera inmuno hasta el final de mi tesis habéis sido unas personas increíbles, además de excelentes revisores y críticos con experimentos e ideas. También recordar a Alicia y su laboratorio, con los que he compartido congresos y han resultado ser personas encantadoras, por toda la ayuda prestada. De compañeros de carrera, a Olga y Javi, porque aunque nos vemos poco nos queremos igual. Tampoco me quiero olvidar de Alison y toda la gente de Glasgow donde estuve de estancia. Gracias por hacerme vivir una experiencia enriquecedora e inolvidable.

Quiero agradecer y reconocer el esfuerzo económico de la Fundación MMA, y sobre todo de la Fundación Ramón Areces al financiar el desarrollo de esta tesis.

Por supuesto a mis amigos “externos” a todo este mundo. A mis hermanos de comunidad (y “respectivas”), y al resto de amigos del grupo de Getafe, Pinto, Valdemoro y Bohadilla. También incluyo a Ángelote, a mi “primo” y su mujer y todos los amigos de Alcalá/Móstoles. Gracias por vuestro interés y por preguntar aunque luego tuvieséis que poner cara de póker al escucharme en plan gafotas. ¡Y gracias por lo que no ha sido ciencia! Carnavales, viajes, nocheviejas, cumpleaños, vacaciones, etc.

Gracias a la familia de Sara, por su interés y apoyo. Y sobre todo gracias a los míos. Sin vosotros no sería nada. A mis primitas y a mi prima un poco mayor. A todos mis tíos y abuelos. También va por vosotros abuelos Margarita y Félix, gracias por cuidarme, yo me sigo acordando mucho de vosotros. A mis hermanos, Nerea y César, porque os quiero, y sois muy importantes para mí. Y a mis padres. Gracias por todo: ayuda, cariño, comprensión... en fin, por hacer de mí la persona que véis. Os dedico ésto por todo el esfuerzo que habéis dedicado por mí durante toda mi vida.

Y finalmente gracias a ti, Sara. Por todas los buenos y malos ratos de mi trabajo que has tenido que aguantar. Por servirme de apoyo y ánimo. Por intentar comprender (o simplemente escuchar) cuando llegaba a casa cansado, quemado o disgustado. Gracias por estar a mi lado y compartir todo.

Con ésto acabo: **gracias a todos.**

Índice

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	II
ABSTRACT	III
INTRODUCCIÓN.....	1
METALOPROTEINASAS DE MATRIZ (MMPs).....	1
Clasificación	1
Estructura	2
Regulación de las MMPs	3
Regulación transcripcional	3
Regulación post-transcripcional	4
Activación de las MMPs.....	4
Inhibidores de las MMPs	4
Otros mecanismos de regulación. Asociaciones protéicas	5
Funciones de las MMPs.....	6
MMPs en cáncer	7
Modelos animales	8
MMP-9	8
Estructura de la MMP-9	8
Regulación de la MMP-9.....	8
Sustratos de MMP-9	9
Inhibidores de MMP-9	9
Funciones de MMP-9	10
Asociación de MMP-9 a la membrana celular	10
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	11
Las integrinas.....	11
El receptor CD44	14
LAS QUIMIOQUINAS	15
Estructura y clasificación	16

Receptores de quimioquinas	17
LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA B (LLC-B)	18
Origen de la enfermedad.....	19
Diagnóstico y clasificación.....	20
Migración e invasión de células LLC-B.....	21
Apoptosis en células LLC-B	23
Modelos animales de la enfermedad	24
 <i>OBJETIVOS</i>	<i>25</i>
 <i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	<i>27</i>
 <i>RESULTADOS</i>	<i>29</i>
Anexo I	29
Anexo II.....	31
Anexo III	33
Anexo IV	35
 <i>DISCUSIÓN.....</i>	<i>37</i>
 <i>CONCLUSIONES.....</i>	<i>49</i>
 <i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>	<i>51</i>
 <i>LISTA DE PUBLICACIONES</i>	<i>65</i>

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ADP Adenosina 5'-difosfato

ADAM *A disintegrin and metalloproteinase*, proteína disintegrina y metaloproteinasa

APMA *Aminophenylmercuric acetate*
Acetato de aminofenilmercurio

BCECF-AM *2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6')-carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester*, 2',7'-bis(carboxietil)-5(6')-carboxifluoresceinato de acetoximetilo

BCR *B-cell receptor*, receptor de células B

BS *Bone sialoprotein*, sialoproteína de hueso

BSA *Bovine serum albumin*, albúmina de suero bovino

CHX Cicloheximida

EDTA *Ethylenediaminetetraacetic acid*, ácido etilen-diamino-tetraacético

EGF *Epidermal growth factor*, factor de crecimiento epidermal

ERK *Extracellular signal-regulated kinase*, quinasa regulada por señales extracelulares

FAK *Focal adhesion kinase*, quinasa de adhesión focal

FBS *Fetal bovine serum*, suero bovino fetal

FGF *Fibroblast growth factor*, factor de crecimiento de fibroblastos

FITC *Fluorescein isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína

FISH *Fluorescence in situ hybridization*, hibridación in situ fluorescente

FN Fibronectina.

FN-H89 Fragmento H89 de la fibronectina

GAPDH Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HSP90 *Heat shock protein 90*, proteína de choque térmico 90

HSPG *Heparan sulfate proteoglycans*, proteoglicanos de tipo heparan sulfato

HUVEC *Human umbilical vein endothelial cell*, célula endotelial de venas de cordón umbilical humano

IGF *Insulin-like growth factor*, factor de crecimiento insulínico

JAK *Janus kinase*, quinasa janus

LLC-B Leucemia linfocítica crónica de tipo B

LRP *Lipoprotein receptor-related protein*, proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas

MAPK *Mitogen-activated protein kinase*, quinasa activada por mitógenos

MEC Matriz extracelular

MMP *Matrix metalproteinase*, metaloproteinasa de matriz

(pro)MMP-9 *Matrix metalproteinase-9*, metaloproteinasa de matriz-9 (proforma y forma activa)

MT-MMP *Membrane-type matrix metalproteinase* Metaloproteinasa de matriz de membrana

NF-κB *Nuclear factor-κB*, factor nuclear κB

PAGE *Poliacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en geles de poliacrilamida.

PAR1 *Protease activated receptor 1*, receptor activador de proteasas 1

PBL *Peripheral blood lymphocyte*, linfocito de sangre periférica

PBS *Phosphate buffered saline*, solución salina tamponada con fosfatos

PEX Dominio hemopexina

PI3-K *Phosphatidylinositol-3 kinase*, quinasa fosfatidilinositol-3

RECK *Reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs*, proteína con motivos kazal que induce reversión

RIPA *Rapid ImmunoPrecipitation Assay*, ensayos de inmunoprecipitación rápida

RT-PCR *Reverse transcription-polymerase chain reaction*, ensayo de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa

SDF-1 *Stromal-cell derived factor-1*, factor derivado de células estromales-1

SDS *Sodium dodecyl sulfate*, dodecilsulfato de sodio

SIBLING *Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein*, pequeña N-glicoproteína ligando de integrinas

siRNA *Small interfering ribonucleic acid*, oligo ribonucleótido de interferencia

STAT *Signal transducer and activator of transcription*, transductor de señal y activador de transcripción

TCR *T-cell receptor*, receptor de células T

TBS *Tris buffered saline*, solución salina tamponada con Tris

TIMP *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase*, inhibidores tisulares de MMPs

TNF- α *Tumor necrosis factor- α* , factor de necrosis tumoral α

TGF- β *Tumor growth factor- β* , factor de crecimiento tumoral β

TM4SF *Transmembrane 4 superfamily domain*, dominio superfamilia de 4 pasos transmembrana

TSP Trombospondina

VCAM-1 *Vascular cell adhesion molecule-1*, molécula de adhesión vascular-1

VEGF *Vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento del endotelio vascular

Abstract

ABSTRACT

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is characterized by the accumulation of mature CD5+ B lymphocytes in the peripheral blood. As the disease progresses, these tumoral cells infiltrate lymphoid tissues. Several molecules that participate in B-CLL cell migration and invasion have been identified. These include the chemokines CCL21, CCL19, and CXCL12, VEGF, and α L β 2 and α 4 β 1 integrins. B-CLL cells produce and secrete gelatinase-B/proMMP-9 and elevated intracellular levels of this MMP correlate with advanced stage and poor patient survival.

In this thesis we show that MMP-9 plays an important role in the transendothelial migration, invasion, survival and pathology of B-CLL cells. We have found that secretion of proMMP-9 by B-CLL cells is up-regulated by α 4 β 1 integrin, CXCR4, or CCR7 engagement via different signaling pathways (PI3K/Akt/NF- κ B for α 4 β 1 or Erk1, 2/c-fos for CXCR4 and CCR7). Besides up-regulating proMMP-9 levels, α 4 β 1 integrin ligation also induces the formation of podosomes in B-CLL cells and the localization of proteolytically active MMP-9 to these invasive structures.

Although mainly present as a secreted soluble form, MMP-9 has also been detected at the B-CLL cell surface. We have studied the molecular associations and possible function of this surface-bound MMP-9. We show that B-CLL cells are able to bind soluble and immobilized pro- and active MMP-9, in contrast to normal B cells. These interactions are mediated by α 4 β 1 integrin and 190-kDa CD44v, which form a novel docking complex at the B-CLL cell surface. The MMP-9 hemopexin domain is critical for this anchorage. Moreover, surface-bound MMP-9 is functional and regulates B-CLL cell arrest and movement through its catalytic activity.

Analyzing other possible roles for surface-bound MMP-9, we describe a novel pathogenic function for this MMP. We show that binding of MMP-9 to B-CLL cells induces an antiapoptotic signaling pathway involving Lyn kinase, STAT3, and myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1). Most importantly, induction of this pathway does not require MMP-9 proteolytic activity, but is rather due to the interaction of MMP-9 with its surface receptors. Thus, MMP-9 possesses previously unknown properties contributing to survival and progression of B-CLL.

Introducción

METALOPROTEINASAS DE MATRIZ (MMPs)

Con la caracterización de la primera actividad colagenasa de una MMP (Gross and Lapiere, 1962) dio comienzo el estudio de estas proteínas y el papel que pueden desarrollar en diversas patologías humanas, especialmente en los procesos tumorales. Se ha descrito la presencia de metaloproteinasas en todo tipo de organismos, desde los no vertebrados (Lepage and Gache, 1990; Llano et al., 2000), plantas y algas (McGeehan et al., 1992) hasta los 28 miembros caracterizados hasta el momento en humanos.

Las MMPs pertenecen a la superfamilia de las metzincinas. Dentro de esta superfamilia se encuentran también englobadas las serralisinas, astacinas y ADAMs/adamalisinas, (Bode et al., 1996; Stocker and Bode, 1995). Todas las metzincinas se caracterizan por tener un motivo altamente conservado **HEXXHXXGXXH**, con tres histidinas que coordinan un átomo de zinc dentro del dominio catalítico y una metionina conservada cercana al sitio activo (Stamenkovic, 2003).

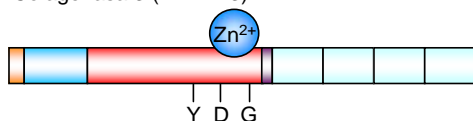
Las MMPs se encuentran implicadas principalmente en regular la integridad y composición de la matriz extracelular (MEC), mediante el procesamiento o degradación de numerosos sustratos pericelulares (Lopez-Otin and Matrisian, 2007; Page-McCaw et al., 2007).

1.- CLASIFICACIÓN

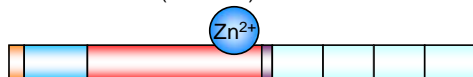
Inicialmente las MMPs se clasificaron según el tipo de componente de la MEC que son capaces de degradar (Sternlicht and Werb, 2001). Así, las MMPs quedaron agrupadas en: colagenasas (MMP-1, -8, -13), gelatinasas (MMP-2, -9), estromilinas (MMP-3, -10, -11, -7), y matrilisinas. Sin embargo, esta clasificación ha quedado obsoleta, ya que se han descrito nuevos sustratos dentro y fuera de la MEC, por lo que actualmente las MMPs se clasifican según su número y estructura (**Figura 1**) (Egeblad and Werb, 2002). Además las MMPs pueden encontrarse en forma soluble (difundiéndose por la MEC), o estar ancladas a membrana (MT-MMPs) a través de 17 dominios transmembrana tipo I o tipo II, o bien a través de glicofosfatidilinositol (GPI).

MMPs típicas*Colagenasas*

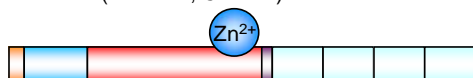
Colagenasa 1 (MMP-1)
Colagenasa 2 (MMP-8)
Colagenasa 3 (MMP-13)

*Estromilisin*

Estromilisina 1 (MMP-3)
Estromilisina 2 (MMP-10)

*Otras MMPs*

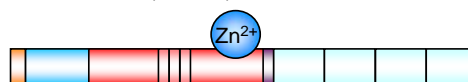
Metaloelastasa (MMP-12)
MMP-19
Enamelisina (MMP-20)
MMP-27 (MMP-22, C-MMP)

**Matrilisin**

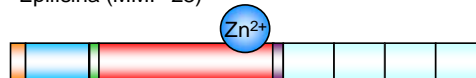
Matrilisina (MMP-7)
Matrilisina 2 (MMP-26)

**Gelatinasas**

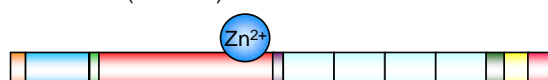
Gelatinasa A (MMP-2)
Gelatinasa B (MMP-9)

**MMPs activables por convertasas***Secretadas*

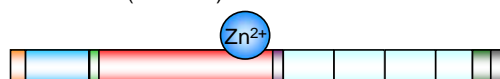
Estromilisina 3 (MMP-11)
MMP-21 (X-MMP)
Epilisina (MMP-28)

*Asociadas a membrana*

MT1-MMP (MMP-14)
MT2-MMP (MMP-15)
MT3-MMP (MMP-16)
MT5-MMP (MMP-24)



MT4-MMP (MMP-17)
MT6-MMP (MMP-25)



MMP-23A
MMP-23B

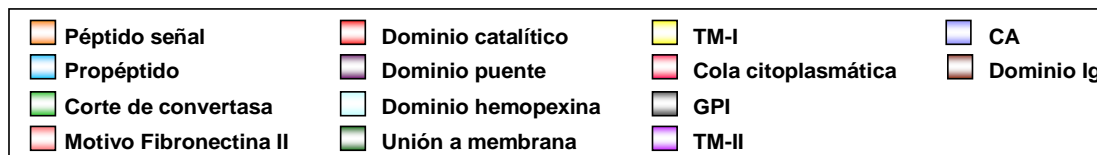
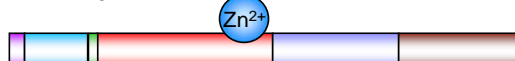


Figura 1. Clasificación y estructura de las MMPs. Modificado de Overall and López Otín, 2002.

2.- ESTRUCTURA

Todas las MMPs presentan una estructura común que se compone básicamente de cuatro dominios conservados: un péptido señal o predominio, situado en el extremo amino-terminal y que se elimina en el retículo endoplasmático, el cual se encarga de determinar si la proteína va a ser secretada o anclada a la membrana. Un propéptido o prodominio, de unos 80-90 aminoácidos que contienen una cisteína conservada que mantiene la enzima en estado latente. Cuando este dominio se procesa, la enzima se activa. El dominio catalítico, de unos 160-170 aminoácidos contiene el sitio activo altamente conservado donde se encuentran las tres histidinas que se unen al zinc catalítico (Overall, 2001). En esta región se determina la especificidad hacia los diferentes sustratos, mediante conformaciones específicas y regiones localizadas fuera

del sitio activo. Por último, todas las MMPs, excepto MMP-7, MMP-26 y MMP-23, presentan un dominio tipo hemopexina de aproximadamente 200 residuos que conecta con el dominio catalítico a través de una región rica en prolinas (Bode et al., 1996; Piccard et al., 2007). El dominio hemopexina o PEX regula la unión de la proteasa a distintos sustratos y a sus inhibidores; interviene en la unión y activación de las MMPs en la membrana celular y dirige ciertas actividades proteolíticas (Van den Steen et al., 2006).

Determinados subgrupos de MMPs poseen otros dominios adicionales específicos. Las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 se diferencian del resto de MMPs al poseer tres dominios fibronectina (FN) tipo II dentro del extremo amino-terminal, que son necesarios para la unión y escisión de colágeno y elastina (Rosenblum et al., 2007). Las MT-MMPs (MMP-14, -15, -16 y -24) tienen un dominio transmembrana seguido de una corta cola citoplásmica de 20 aminoácidos en el extremo carboxilo-terminal. Adicionalmente, MMP-17 y MMP-25 poseen una región hidrofóbica que actúa como señal de anclaje a membrana de tipo GPI (Nagase and Woessner, 1999; Overall and Lopez-Otin, 2002).

3.- REGULACIÓN DE LAS MMPs

Debido a sus múltiples funciones fisiológicas, en las cuales las MMPs actúan como interruptor dual activando o inactivando función, es necesario que estas enzimas estén estrictamente reguladas en múltiples niveles, de forma que únicamente se expresen y sean activas en el tipo celular, momento y lugar adecuados (Sternlicht and Werb, 2001). Además, el papel de las MMPs en cáncer las convierte en candidatas a posibles dianas terapéuticas que frenen la progresión tumoral. En este sentido se han seguido hasta el momento varias estrategias encaminadas a bloquear la actividad proteolítica de estas enzimas (Hidalgo and Eckhardt, 2001).

3.1 Regulación transcripcional

Con la excepción de la MMP-2, cuya expresión es constitutiva y se encuentra regulada principalmente por activación enzimática y por la estabilidad de su ARN mensajero (Overall et al., 1991; Strongin et al., 1995), la mayoría de las MMPs se encuentran muy reguladas a nivel transcripcional. La expresión génica de las MMPs se encuentra regulada por la señalización a través de integrinas y receptores celulares, estrés oxidativo, activación con ésteres de forbol y cambios en la fisonomía celular (Westermarck and Kahari, 1999). Asimismo, varios factores solubles regulan también la

transcripción génica de MMPs, como es el caso de citoquinas y factores de crecimiento (EGF, VEGF, TNF- α , TGF- β), hormonas y el inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular, EMMPRIN (Overall, 2001; Westermarck and Kahari, 1999). Se ha descrito como el tratamiento con interferones o glucocorticoides, el bloqueo de receptores celulares, o el silenciamiento de diversas rutas de señalización inhiben la transcripción de MMPs (Bauvois et al., 2002; Egeblad and Werb, 2002; Nguyen et al., 2005).

3.2 Regulación post-transcripcional

Otro mecanismo de regulación génica de las MMPs es la estabilización o desestabilización del ARN mensajero. Ciertos factores de crecimiento son capaces de estabilizar el ARN mensajero de algunas MMPs. Es el caso del EGF o los ésteres de forbol con los ARN mensajeros de MMP-1 y MMP-3 (Stamenkovic, 2003), o de PDGF y los glucocorticoides con el ARN mensajero de MMP-13 (Delany et al., 1995). Otros factores solubles, como el TGF- β , produce el efecto contrario, desestabilizando el ARN.

3.3 Activación de las MMPs

Como se ha mencionado, todas las MMPs son sintetizadas como zimógenos. Para su activación enzimática, es necesaria la ruptura del enlace cisteína-zinc, mediante un cambio conformacional de la proteína (inducido por compuestos organomercuriados, urea, detergentes o especies reactivas de oxígeno) o la proteólisis del propéptido (por plasmina u otras MMPs). La gran mayoría de las MMPs son secretadas en forma latente y pasan a conformación activa en el exterior celular (Stamenkovic, 2003). Otras MMPs, como es el caso de MMP-11, MMP-27 y las MT-MMPs, poseen un motivo de reconocimiento por convertasas de tipo furina **RXRR** o **RXKR**, que les permite activarse intracelularmente durante la ruta de secreción (Sato et al., 1996). Se ha analizado el bloqueo de MMPs mediante el uso de anticuerpos (Galvez et al., 2001), o mediante la inhibición de las proteasas encargadas de activar las MMPs (como es el caso de las furinas) (Bassi et al., 2001).

3.4 Inhibidores de las MMPs

La actividad de las MMPs está regulada también por una serie de inhibidores endógenos naturales. Es el caso de la α 2-macroglobulina que es el principal inhibidor irreversible endógeno de las MMPs en el plasma y fluido tisular (Baker et al., 2002). Sin embargo, la principal familia de inhibidores específicos de las MMPs son los TIMPs (inhibidores tisulares de MMPs) (Baker et al., 2002). Sus 4 miembros (TIMP-1 a -4) son proteínas

de 21-30 kDa capaces de inactivar las MMPs a través de su unión directa y reversible al dominio catalítico de las MMPs (Brew et al., 2000). TIMP-1 y TIMP-2 son capaces de inhibir un amplio espectro de MMPs, aunque con diferente efectividad dependiendo del tipo de proteasa que sea, mientras que la especificidad de TIMP-3 y TIMP-4 es más restringida (Brew et al., 2000). Recientemente, se han propuesto nuevas funciones para los TIMPs además de la inhibición de MMPs y que implicarían señalización intracelular (D'Alessio et al., 2008; Jiang et al., 2002; Stetler-Stevenson, 2008). Existe también otro grupo de inhibidores formados por los fragmentos procesados de determinadas proteínas (Overall and Lopez-Otin, 2002). Por último, se ha descrito también que la proteína RECK, es capaz de inhibir a MMP-2, MMP-9 y MT1-MMP (Miki et al., 2007; Oh et al., 2001).

Dada la selectividad y efectividad de los TIMPs para bloquear la actividad catalítica de las MMPs, se han utilizado como inhibidores de la migración tumoral (Overall and Lopez-Otin, 2002). Actualmente se están desarrollando nuevos inhibidores sintéticos basados en mimetizar el sitio catalítico de la MMP. Este es el caso de los inhibidores comerciales Batimastat (BB-94) o Marimastat (BB-2516) (Wojtowicz-Praga et al., 1997). Además, existen otros compuestos no peptídicos, capaces de inhibir la actividad de las MMPs, como son los derivados de tetraciclinas, bifosfonatos, o un componente del té verde que se encuentra actualmente en fase III de estudios clínicos. Sin embargo, los resultados obtenidos con estos inhibidores no han tenido la eficacia esperada (Fisher and Mobashery, 2006).

3.5 Otros mecanismos de regulación. Asociaciones proteicas

La asociación de algunas MMPs en la membrana celular puede ser crítica para la regulación y función de la enzima en el espacio pericelular. Para ello, ciertas proteasas, como es el caso de MT1-MMP, se encuentran ancladas a la membrana y se localizan junto a integrinas y caveolas, o en determinadas zonas de la superficie celular como balsas lipídicas o invadopodia (Itoh and Seiki, 2004; Nakahara et al., 1997). También se ha visto una asociación entre la actividad o presencia de MMPs solubles con proteínas de anclaje (*docking molecules*), receptores celulares, o en determinados dominios de la membrana (**Figura 2**).

MMP	Proteína de anclaje	MMP	Proteína de anclaje
MMP-1	Integrinas ($\alpha 1\beta 1$ $\alpha 2\beta 1$) EMMPRIN PAR1 LRP	MMP-3	Osteopontina
MMP-2	Integrinas ($\alpha v\beta 3$) Cadenas de colágeno TSP-2 TIMP-2 Caveolina-1 HSP90 α MT1-MMP BS	MMP-9	Integrinas ($\alpha L/M\beta 2$; $\alpha 5\beta 1$; $\alpha 3\beta 1$; $\alpha v\beta 5$) Cadenas de colágeno RECK CD44 ICAM-1 LRP Proteína Ku TIMP-1 TSP-1
MMP-7	CD44HSPG TM4SF CD151	MT1-MMP	Integrinas ($\alpha v\beta 3$; $\beta 1$) CD44 TIMP-2 Colágeno tipo I RECK

Figura 2. Proteínas de anclaje y asociación en membrana de MMPs.

4.- FUNCIONES DE LAS MMPS

Debido a su capacidad de degradar múltiples sustratos, las MMPs desempeñan un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos (morfogénesis tisular, invasión y migración celular, reparación de heridas, vasculogénesis o desarrollo del hueso) y patológicos (cáncer, enfermedades inflamatorias, autoinmunes, cardiovasculares, fibróticas y cerebrovasculares) (Egeblad and Werb, 2002).

Las MMPs influyen en el comportamiento celular al liberar numerosas sustancias de señalización solubles que permanecen ancladas en la MEC, como TGF- β o FGF-1 que al unirse a sus receptores celulares desencadenan múltiples cascadas de señalización (Imai et al., 1997; Whitelock et al., 1996). Por otro lado, las MMPs son capaces de procesar moléculas de la superficie celular, o ligandos de receptores celulares, lo que conlleva a su activación o inactivación, desencadenando o bloqueando así distintas vías de señalización celular (Cauwe et al., 2008; Cauwe et al., 2007).

Otra función celular fundamental de las MMPs es regular la angiogénesis. Las MMPs favorecen la migración celular y la formación de vasos sanguíneos, mediante el procesamiento de factores pro (VEGF, bFGF, TGF- β) o antiangiogénicos (angiostatina y endostatina). También pueden regular esta función proteolizando diversos receptores celulares (receptor activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, uPAR; el receptor de TGF- β de tipo III, betaglicano; o cadherinas del tipo VE) (Imai et al., 1997; Luca et al., 1997; Mira et al., 2004; Stamenkovic, 2003; Yu and Stamenkovic, 2000).

5.- MMPs EN CÁNCER

Como se ha comentado previamente, la actividad de las MMPs en patologías se ha asociado principalmente con la invasión tumoral y la metástasis (Deryugina and Quigley, 2006). Sin embargo recientemente se ha propuesto también su posible papel en etapas tempranas del desarrollo tumoral (Stamenkovic, 2003). Más específicamente, se ha descrito que algunas MMPs son capaces de promover o inhibir la proliferación celular a través del procesamiento de moléculas como el receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos (FGR-1), el receptor de tirosinas quinasas tipo HER2, o el factor de crecimiento epidermal de unión a heparina (HB-EGF) (Egeblad and Werb, 2002). También se ha descrito un papel de las MMPs en la inducción de supervivencia o apoptosis en las células tumorales, a través de la inactivación o liberación del ligando de Fas (FasL) o la ruptura del propio receptor Fas (Mitsiades et al., 2001). Del mismo modo, el proceso de angiogénesis antes mencionado y regulado por MMPs, resulta fundamental en la progresión tumoral.

Por otro lado, se ha descrito el papel fundamental de las MMPs en los procesos de metástasis. La migración de células tumorales requiere la remodelación tisular y la degradación parcial de la MEC, seguido de una migración posterior de la célula cancerosa a focos de metástasis. Por ejemplo, se ha observado el papel de determinadas MMPs en la degradación de la membrana basal del endotelio durante la intravasación de las células tumorales (Deryugina and Quigley, 2006). Algunas MMPs también son capaces de procesar quimioquinas o citoquinas necesarias para la migración celular. Este es el caso de MMP-2 que proteoliza e inactiva a la quimioquina CXCL7, o de MMP-9 que potencia la actividad de IL-8, o inactiva a CXCL12 (McQuibban et al., 2001; Van den Steen et al., 2003).

Por último, se ha descrito que determinadas regiones extracelulares sirven de nichos para albergar a células troncales o tumorales. Estos nichos poseen un ambiente extracelular diferente al que se encuentran las células en su proceso migratorio, y suele estar enriquecido en diversos factores solubles que permiten a las células estacionarse, dividirse, o migrar. En estos ambientes también se ha propuesto que las concentraciones de MMPs pueden jugar un papel fundamental en el reclutamiento y estacionamiento de las células (Sneddon and Werb, 2007).

6.- MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LAS MMPs

La creación de ratones deficientes para genes específicos de MMPs contribuye de forma fundamental al estudio de las funciones de las mismas. La mayoría de los ratones deficientes para MMPs son viables y no presentan grandes diferencias fenotípicas respecto a los ratones de genotipo silvestre (Page-McCaw et al., 2007). Sin embargo algunos de los defectos más significativos de estos ratones se encuentran en el proceso de angiogénesis, el desarrollo o remodelamiento del hueso o alteraciones en el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. (Egeblad and Werb, 2002).

MMP-9

1.- ESTRUCTURA DE LA MMP-9

La MMP-9 o gelatinasa B, sobre la que se centrará el estudio de esta tesis, posee una estructura basada en un prodominio seguido del dominio catalítico, un dominio de colágeno tipo V (específico de MMP-9 y que no posee MMP-2) muy glicosilado y que sirve de puente a la región hemopexina o PEX (Mattu et al., 2000; Van den Steen et al., 2004) (**Figura 3**). La región PEX determina la especificidad de MMP-9 y juega un papel fundamental en su unión a otras moléculas. La característica específica de las gelatinasas, y que las diferencia de otras MMPs, es la región con tres dominios fibronectina tipo II capaces de unir gelatina, laminina y colágeno tipo I, II, III, IV y V (Rosenblum et al., 2007).

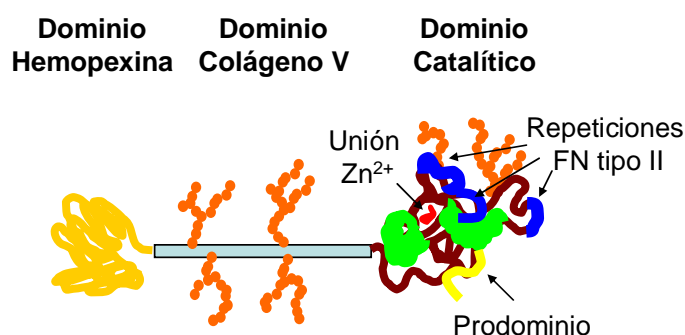


Figura 3. Estructura de MMP-9. La MMP-9 posee un prodominio que bloquea el sitio catalítico donde se encuentra el ión Zn. Además posee 3 regiones de homología FN tipo II, un dominio colágeno tipo V muy glicosilado y un dominio hemopexina (PEX) con diversas funciones.

2.- REGULACIÓN DE LA MMP-9

MMP-9 es producida principalmente por células monocíticas como neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas (Bjorklund and Koivunen, 2005). También los linfocitos T y B son capaces de producir MMP-9 (Esparza et al., 1999; Trocme et al.,

1998). En todos los casos su expresión es inducible por determinados estímulos que activan su expresión (IL-1, IL-2, ésteres de forbol, lectinas, adhesión celular) o la reprimen (IL-4, IL-10, interferones), mediante la activación de diversos factores de transcripción capaces de unirse al promotor de MMP-9: AP-1, SP1, PEA3, TIE, KRE, RCE o NF- κ B (Trocme et al., 1998; Yakubenko et al., 2000). Las glicoproteínas SIBLINGs (Bjorklund and Koivunen, 2005) y la adhesión a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$ (Yakubenko et al., 2000) también incrementan la expresión de MMP-9. En el caso de los leucocitos, existe un mecanismo adicional de control, basado en la liberación de los gránulos que contienen la proteasa junto con otras proteínas, como la integrina $\alpha M\beta 2$ (Bjorklund et al., 2006).

Para la activación de MMP-9 se han propuesto varios mecanismos, muchos de los cuales implican su procesamiento en la membrana celular (Atkinson and Senior, 2003; Bergers et al., 2000; Van den Steen et al., 2002). Este es el caso de la estromielisina 1 (MMP-3), la plasmina, el eje MT-1MMP/MMP-2, o la propia MMP-9 activada (Geurts et al., 2008; Imai et al., 1997; Toth et al., 2003). También otras proteasas pueden ser activadores de MMP-9, como la tripsina de tipo 2 asociada a tumores, la quimiotripsina de piel y las quimasas α y β de mastocitos. MMP-9 también es capaz de activarse de manera química, vía oxidativa (como hacen los neutrófilos), por la generación de radicales 2- y 4-hidroxiestradiolos o por compuestos organomercuriales (como el APMA) (Paquette et al., 2003; Peppin and Weiss, 1986).

3.- SUSTRATOS DE MMP-9

MMP-9 es capaz de procesar múltiples sustratos, entre los que se incluyen proteínas de la MEC (gelatina, elastina, fibrilina, laminina y colágeno tipo IV, V, XI y XVI), además de otras proteínas como proteasas, inhibidores de proteasas, quimioquinas, el oncogen relacionado con crecimiento GRO- α , o el factor plaquetario 4, citoquinas (proIL-1 β e IL-8) y receptores celulares (Atkinson and Senior, 2003; Opdenakker et al., 2001; Rosenblum et al., 2007). La diferencia de especificidad de sustrato entre MMP-9 y MMP-2 se debe fundamentalmente a que MMP-9 presenta en el dominio catalítico una región con diferentes residuos ácidos que reconocen al sustrato (Chen et al., 2003).

4.- INHIBIDORES DE MMP-9

Los inhibidores fisiológicos $\alpha 2$ -macroglobulina y TIMP-1 son capaces de inhibir la actividad enzimática de MMP-9 de forma muy eficiente. Además existen otras

moléculas capaces de inhibir la actividad de MMP-9, como el fragmento endostatina, procedente de la proteólisis de colágeno XVII, la trombospondina-1 o la proteína RECK (Mook et al., 2004; Oh et al., 2001). Actualmente diversos inhibidores sintéticos están siendo probados en el tratamiento de múltiples enfermedades, como el mencionado Batimastat (BB-94), o Prinomastat (AG3340), tetraciclinas, o el prodominio de MMP-3 (Hu et al., 2005; Hu et al., 2004b; Martens et al., 2007). La inhibición de la actividad de MMP-9 bloquea la migración e invasión e induce apoptosis en las células cancerosas (Bjorklund et al., 2004; Nyormoi et al., 2003). Sin embargo, recientemente se ha descrito que en determinados tipos celulares al silenciar o inhibir MMP-9 se obtiene el efecto contrario al promover la migración de las células tumorales (Deryugina et al., 2005; Partridge et al., 2007).

5.- FUNCIONES DE MMP-9

Ya que las células del sistema inmune son importantes productoras de MMP-9, las principales funciones de esta MMP se basan en la movilización de células madre de la médula ósea, o de linfocitos y leucocitos en respuesta a factores solubles de inflamación. Como se ha comentado, MMP-9 también interviene en los procesos de migración e invasión tumoral, al ser capaz de liberar diversas sustancias de la MEC (VEGF y TGF- β) al medio extracelular, promoviendo la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Bergers et al., 2000). También se ha descrito la posible relación de MMP-9 con la GTPasa RhoA, favoreciendo la adhesión celular (Sanceau et al., 2003). Además, también se ha descrito el papel antiapoptótico de MMP-9 en diferentes situaciones (Acuff et al., 2006; Kunigal et al., 2008; Ringshausen et al., 2004). El fenotipo del ratón KO para MMP-9 presenta deficiencias en la remodelación ósea, defectos en la fertilidad del individuo, y un efecto protector frente a enfermedades asociadas a procesos inflamatorios y cáncer (Nabha et al., 2006).

6.- ASOCIACIÓN DE LA MMP-9 A LA MEMBRANA CELULAR

Aunque MMP-9 es una proteasa soluble, como ya hemos comentado puede también localizarse en la membrana celular por su unión a diferentes proteínas de membrana, llamadas *docking molecules*. Se ha descrito que una pequeña parte de la enzima se encuentra anclada en la membrana de células endoteliales, neutrófilos, y diversos tipos de células tumorales (mama, páncreas y ovario entre otras) (Bjorklund and Koivunen,

2005). Dicha localización desempeña una función fundamental en la activación y actividad de MMP-9 (Fridman et al., 2003).

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Las moléculas de adhesión son glicoproteínas de membrana que funcionan como receptores de ligandos presentes en otras células o en la matriz extracelular. La interacción de estas moléculas con sus ligandos constituye el soporte celular para su correcta disposición y función, participando en procesos como diferenciación, migración celular, organogénesis y desarrollo y función de las células hematopoyéticas del sistema inmune.

1.- LAS INTEGRINAS

El término integrina se propuso para describir a una familia de receptores de membrana que integraban el citoesqueleto celular con la MEC (Hynes, 1992). Las integrinas están implicadas en gran diversidad de procesos, y se expresan prácticamente en todos los tejidos y tipos celulares. Su importancia, además de durante el desarrollo y homeostasis, se basa en su papel esencial en determinados procesos del sistema inmune, tales como la adhesión leucocitaria al endotelio y su posterior extravasación hacia tejidos u órganos linfoides secundarios, recirculación leucocitaria, adhesión a células presentadoras de antígeno, inducción de muerte por citotoxicidad, procesos inflamatorios, y control del ciclo y de la diferenciación celular entre otros (Hynes, 2002; Kinashi, 2005). Se conocen 18 subunidades α y 8 subunidades β , cuya combinación da lugar al menos a 24 integrinas diferentes (**Figura 4**). De entre ellas, la integrina $\alpha 4 \beta 1$ ha sido objeto de estudio detallado en esta tesis.

En cuanto a su estructura, las integrinas son proteínas heterodiméricas de tipo I, formadas por la unión no covalente de una subunidad α (120-180 KDa) y una β (90-110 KDa). Ambas están compuestas por un pequeño dominio citoplasmático, una región transmembrana y un dominio extracelular (Pribila et al., 2004). Las integrinas se unen a su ligando a través de los extremos amino-terminales de las dos subunidades, donde se agrupan dominios imprescindibles para este reconocimiento.

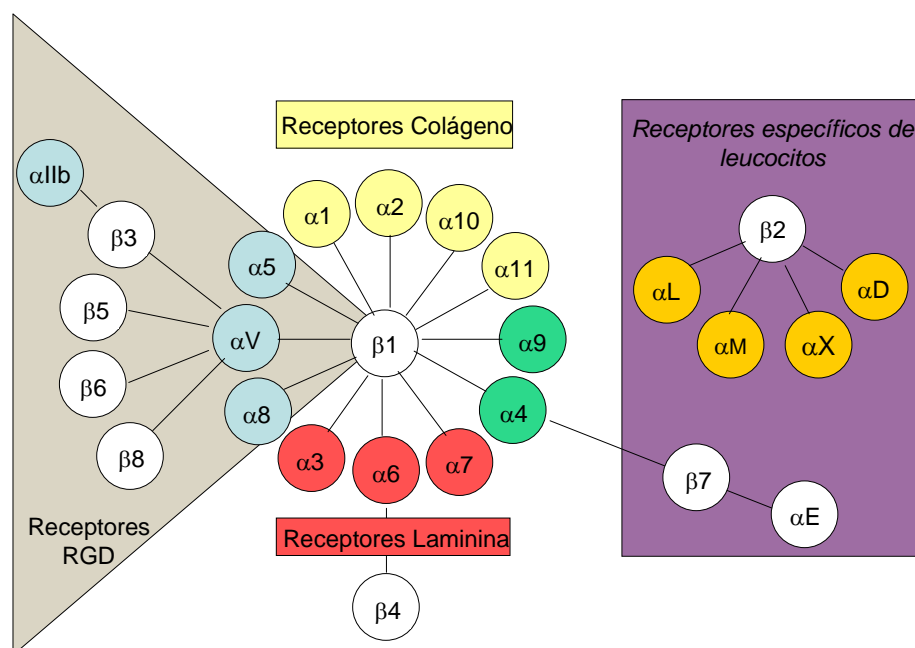


Figura 4. Clasificación de integrinas en mamíferos. Se muestran las posibles combinaciones entre las subunidades α y β . Las integrinas marcadas en amarillo se unen a colágeno; las marcadas en rojo a laminina; las marcadas en azul reconocen a la secuencia RGD presente en varias proteínas, y las integrinas de expresión restringida a leucocitos están marcadas en naranja (Hynes, 2002).

La actividad de las integrinas está altamente regulada y existen numerosos procesos que median su activación o desactivación. La unión de las integrinas a su ligando puede ser inducida mediante cambios en la afinidad y/o avidéz. Las variaciones en la afinidad se deben a cambios conformacionales de la integrina que conducen a un incremento en la interacción integrina-ligando (Chan *et al.*, 2003; Kinashi, 2005). Los cambios de avidéz implican la agrupación o *clustering* de integrinas, dando como consecuencia una mayor fuerza adhesiva conjunta (Hughes and Pfaff, 1998; Hynes, 1992).

La integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4, CD49d/CD29)

Como se indica en la **Figura 4**, la subunidad $\alpha 4$ puede formar heterodímeros con las subunidades $\beta 1$ o $\beta 7$, expresándose principalmente en linfocitos, monocitos, basófilos, eosinófilos, mastocitos, timocitos y progenitores hematopoyéticos (Lobb and Hemler, 1994; Rose *et al.*, 2002). También pueden expresarse en otros tipos celulares como células de la cresta neural y en células tumorales de origen no hematopoyético como el melanoma (Bednarczyk and McIntyre, 1992).

La integrina $\alpha 4\beta 1$ ó VLA-4 (*very late antigen-4*) tiene una gran importancia en procesos inflamatorios, recirculación linfocitaria, hematopoyesis y organogénesis (Lobb and Hemler, 1994; Rose *et al.*, 2002). Además, está implicada en la adhesión de

progenitores hematopoyéticos al estroma de la médula ósea (Teixido et al., 1992), requiriéndose su función para el correcto desarrollo de progenitores de linfocitos B y T en médula (Arroyo *et al.*, 1996). Asimismo, $\alpha 4\beta 1$ juega un papel importante en patologías inflamatorias como asma bronquial, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y aterosclerosis, entre otras (Lobb and Hemler, 1994; Rose *et al.*, 2002), y podría asimismo afectar al desarrollo de distintos tumores como la leucemia mieloide crónica (Verfaillie *et al.*, 1992), el mieloma múltiple (Uchiyama et al., 1992) y la leucemia linfocítica crónica B (Nuckel et al., 2009).

Los principales ligandos de la integrina $\alpha 4\beta 1$ son VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) y fibronectina (FN). VCAM-1 es una glicoproteína de membrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa fundamentalmente en células endoteliales activadas (Osborn *et al.*, 1989), en células estromales de médula ósea y bazo, y en células dendríticas (Castro et al., 1997; Jacobsen et al., 1996; Salomon et al., 1997; Salomon et al., 1994). La expresión de VCAM-1 puede inducirse por diversos factores, como TNF- α , IL-1, IL-4 e IL-13 (Neish et al., 1992; Osborn et al., 1989; Sironi et al., 1994; Swerlick et al., 1992). Estructuralmente, está formada por 7 repeticiones de dominios de inmunoglobulina, aunque es expresada en formas de 6 u 8 dominios como consecuencia de *splicing* alternativo (**Figura 5**). Los dominios 1 y 4 son los responsables de su unión a la integrina $\alpha 4\beta 1$, aunque también se ha observado su interacción con otras integrinas como $\alpha D\beta 2$ y $\alpha 9\beta 1$ (Grayson et al., 1998; Taooka et al., 1999).

La fibronectina es una glicoproteína de 450 kDa presente tanto en la MEC como en forma soluble en plasma y otros fluidos. Está formada por dos cadenas polipeptídicas A y B unidas por puentes disulfuro en su extremo carboxilo-terminal. Como se observa en la **Figura 5**, la FN está compuesta por repeticiones de tres tipos de homología estructural I, II y III, que contienen sitios de unión a macromoléculas como fibrina, heparina, proteoglicanos, o a células. La FN media adhesión celular a través de dos regiones fundamentalmente: la región central de la molécula que contiene la secuencia RGD, capaz de unir las integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ y la integrina $\alpha 4\beta 1$ en conformación activa (Sanchez-Aparicio et al., 1994), y la región IIICS con el sitio CS1 que es el principal ligando constitutivo de $\alpha 4\beta 1$ (García-Pardo et al., 1990a). Existen además otras regiones de interacción con células, situadas en los dominios de unión a heparina HepI, HepII y HepIII (García-Pardo et al., 1990b, Moyano et al., 1999).

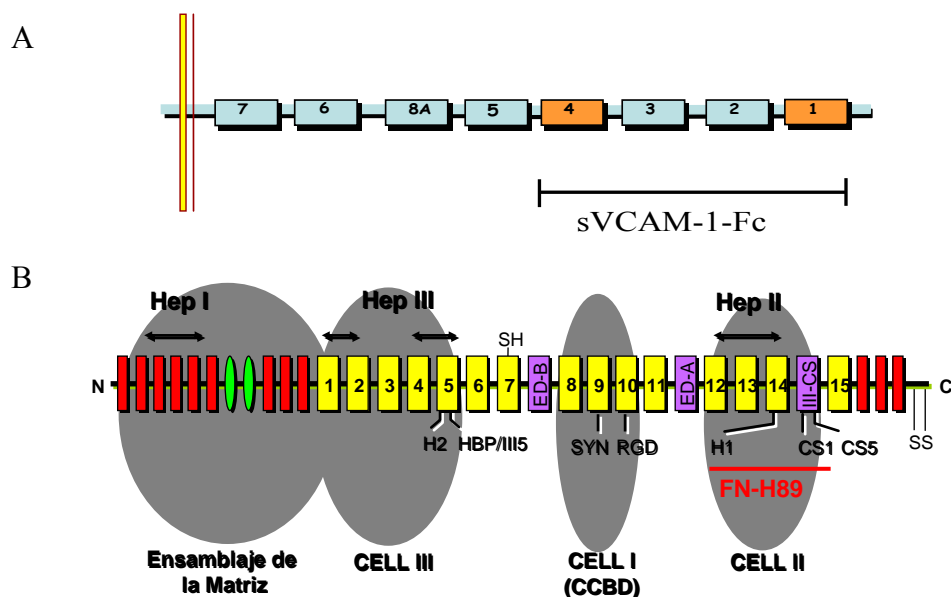


Figura 5. Estructura de VCAM-1 y de fibronectina. (A) La estructura de VCAM-1 mostrando los 8 dominios de tipo inmunoglobulina, de los cuales los dominios 1 y 4 son reconocidos por la integrina $\alpha 4 \beta 1$. En este trabajo se ha utilizado una forma recombinante soluble de VCAM-1 humano (sVCAM-1-Fc) que contiene únicamente los dominios del 1 al 4. (B) La molécula de FN, con sus distintos dominios estructurales y funcionales. Las tres regiones de interacción con células (CELL I, II y III) están indicadas con sus respectivos sitios activos. En el extremo carboxilo-terminal de la cadena aparece el dominio III-CS, en el que se encuentra el motivo CS-1 ligando de alta afinidad de $\alpha 4 \beta 1$. El fragmento recombinante FN-H89 (en rojo), usado en este trabajo, contiene este motivo.

2.- EL RECEPTOR CD44

Otro receptor fundamental durante el desarrollo de esta tesis ha sido CD44. CD44 comprende a una familia de glicoproteínas que actúan como receptores de glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico, aunque también pueden unir colágeno, laminina y fibronectina (Ponta et al., 2003). La complejidad de CD44 radica en que todas las isoformas provienen de un único gen capaz de sufrir distintos *splicing* alternativos (Marhaba and Zoller, 2004) (**Figura 6**). A través de la región citoplasmática, CD44 es capaz de unir proteínas asociadas al citoesqueleto, como ankirina y los miembros ezrina, radixina y moesina (ERM), así como de iniciar señales intracelulares a través de PKC, RhoA, o de Src quinasas como Lck, Fyn y Lyn (Marhaba and Zoller, 2004). Mientras que la isoforma estándar CD44H es ubicua, las isoformas variables de CD44 (CD44v), se describieron en un principio en diversos tipos de células tumorales (Naor et al., 1997). Además, CD44 es capaz de proteolizarse, liberándose de la membrana en forma soluble y acumularse en el medio extracelular, en el plasma o fluidos (Cichy and Pure, 2003) o internalizarse al núcleo de la célula enviando señales intracelulares (Lee et al., 2009).

CD44 es importante durante la morfogénesis, organogénesis, hematopoyesis y *homing* linfocitario, migración celular, activación linfocitaria, adhesión celular y apoptosis. Para llevar a cabo sus funciones, no solamente actúa como receptor celular para los distintos componentes de la MEC, también es capaz de actuar como plataforma para el anclaje de diversos factores solubles o metaloproteinasas (como MMP-9 y MMP-7) lo cual favorece la migración (Ponta et al., 2003; Yu and Stamenkovic, 1999; Yu and Stamenkovic, 2000).

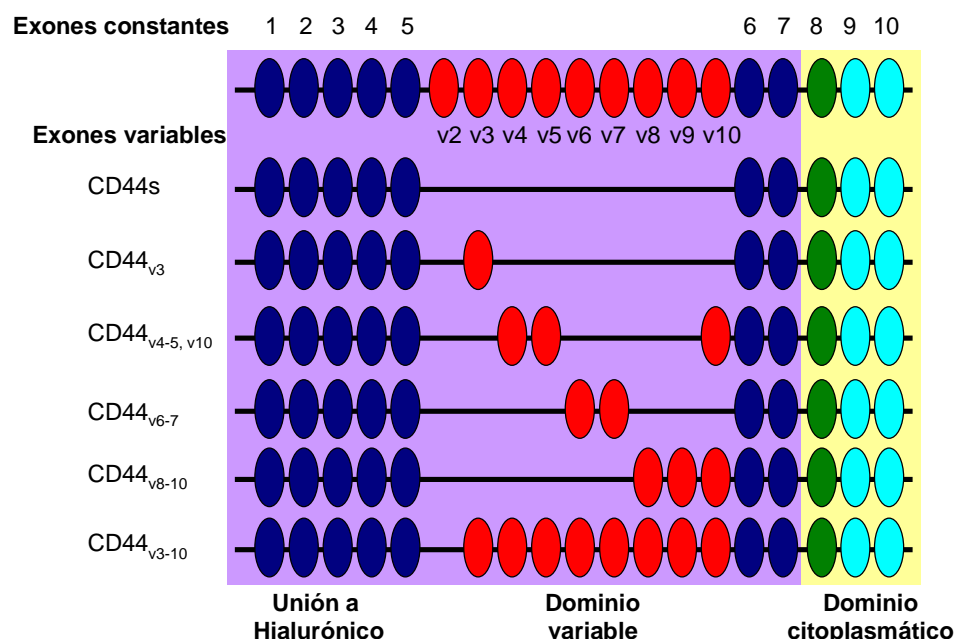


Figura 6. Estructura de las diversas isoformas de CD44. La organización génica de CD44 da lugar a una isoforma estándar (CD44H) y las isoformas variables (CD44v) que expresan varios exones localizados en la región extracelular y cerca de la zona transmembrana de la molécula.

LAS QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas constituyen una superfamilia de citoquinas básicas formada por más de 50 miembros de bajo peso molecular (7-15 KDa) con un elevado grado de homología entre sí (Proudfoot, 2002). Excepto las quimioquinas CXCL16 y CX3CL1 que realizan su función adheridas a la membrana celular, el resto son proteínas solubles secretadas (Allen et al., 2007). Entre sus principales funciones, se ha descrito su capacidad para reclutar a diversos tipos celulares a sitios de inflamación (Muller et al., 2001; Zlotnik and Yoshie, 2000). También se ha visto su papel durante la maduración, recirculación y activación leucocitarias (Zlotnik and Yoshie, 2000), en regulación de respuestas Th1 o Th2 (Sallusto et al., 1998) hematopoyesis y angiogénesis (Moser et al., 2004; Rossi and

Zlotnik, 2000). Además las quimioquinas actúan como moduladoras de la adhesión y migración celular (Campbell et al., 1998; Grabovsky et al., 2000; Peled et al., 1999) y activan señales intracelulares tras unirse a sus receptores (Mellado et al., 2001).

Las quimioquinas intervienen en la migración tumoral y el desarrollo de tumores, lo que las convierte en candidatas para estudiar su influencia sobre la expresión de MMPs. CXCR4 está implicado en los procesos de metástasis en pulmón, hígado y médula ósea; mientras que CCR7 media las metástasis a ganglios (Zlotnik, 2004). La inhibición de estos receptores bloquea la metástasis y el crecimiento tumoral en estadios tempranos de algunos tipos de cáncer (Muller et al., 2001).

Familia	Receptor	Ligando
CXC	CXCR1	CXCL6, 7, 8
	CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8
	CXCR3	CXCL9, 10, 11
	CXCR3b	CXCL4
	CXCR4	CXCL12
	CXCR5	CXCL13
	CXCR6	CXCL16
XC	XCR1	XCL1, 2
CX3C	CX3CR1	CX3CL1
CC	CCR1	CCL3, 3L1, 4, 5, 6, 9/10, 14, 15, 16, 23
	CCR2	CCL2, 7, 8, 11, 12, 13, 16
	CCR2b	CCL8
	CCR3	CCL5, 6, 7, 11, 13, 15, 16, 23, 24, 26, 28
	CCR4	CCL17, 22
	CCR5	CCL3, 3L1, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 16
	CCR6	CCL20
	CCR7	CCL19, 21
	CCR8	CCL1, 16
	CCR9	CCL25
	CCR10	CCL27, 28

Figura 7. Clasificación de las quimioquinas. Familia y subfamilias de las quimioquinas en función de la posición relativa de las dos cisteínas del extremo amino-terminal. Se indica el nombre común y el receptor de cada una de ellas. En este trabajo se ha estudiado el papel de las quimioquinas CXCL12, CCL19 y CCL21 (resaltadas en color rojo junto a sus receptores).

1.- ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

Estructuralmente, las quimioquinas se caracterizan por tener cuatro residuos de cisteína altamente conservados en el extremo amino-terminal, los cuales forman dos puentes disulfuro, entre la primera y tercera, y entre la segunda y cuarta cisteína (Rossi and Zlotnik, 2000). Según la posición que ocupen las dos cisteínas más próximas al extremo amino-terminal las quimioquinas se clasifican en 4 familias estructurales: CXC, con un

aminoácido entre ambas cisteínas; CC, con las 2 cisteínas contiguas; C, que sólo poseen una cisteína en el extremo amino-terminal; y CX3C, con 3 aminoácidos entre las cisteínas (Zlotnik and Yoshie, 2000) (**Figura 7**). Las quimioquinas y sus receptores se han clasificado a su vez en homeostáticas (o constitutivas) e inflamatorias (o inducibles) (Proudfoot, 2002).

2.- RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas ejercen su función a través de la unión a receptores de siete dominios transmembrana (7TM) acoplados a proteínas G (Pierce et al., 2002). La interacción entre la quimioquina y su receptor da lugar a cambios conformacionales activándose diversas rutas de señalización (Marinissen and Gutkind, 2001; Pierce et al., 2002), como se esquematiza en la **Figura 8**. Además, las quimioquinas también pueden activar a las integrinas (Grabovsky et al., 2000; Luster et al., 2005). Durante el desarrollo de esta tesis, nos hemos centrado en analizar el papel de las quimioquinas CXCL12 y CCL19 y CCL21 y su señalización en la inducción de MMP-9.

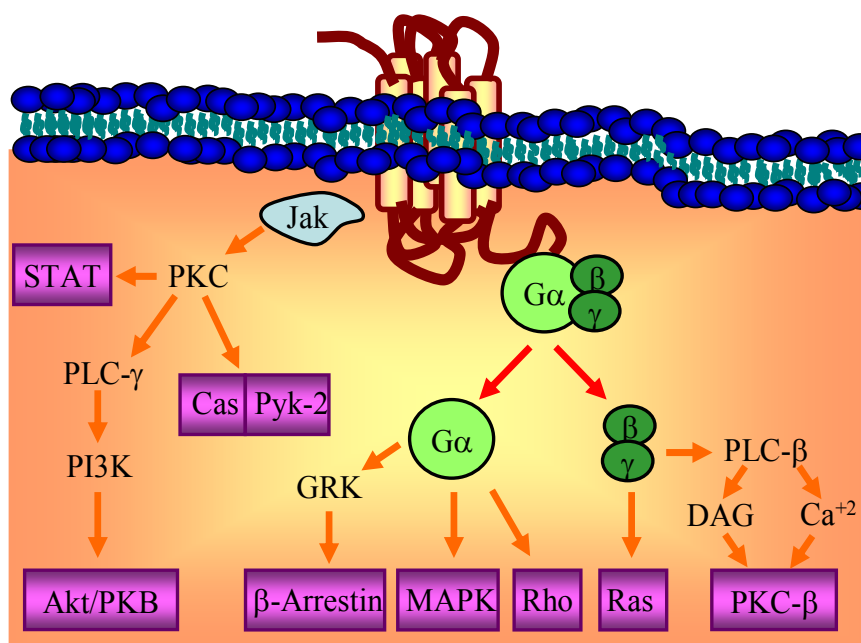


Figura 8. Señalización intracelular a través de receptores de quimioquinas. Las principales rutas de señalización activadas a través de los receptores de quimioquinas comprenden cambios en la expresión génica, reorganización del citoesqueleto, motilidad celular y activación de receptores celulares, entre otras.

La quimioquina CXCL12 y su receptor CXCR4

La quimioquina CXCL12, o SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*) se expresa constitutivamente en muchos tipos celulares (Bleul et al., 1996b; D'Apuzzo et al., 1997), y su ARN mensajero puede dar origen a tres polipéptidos distintos de cierta similitud

entre sí: las formas α , β y γ (Shirozu et al., 1995). CXCL12 desarrolla un papel fundamental en los procesos de hematopoyesis, cardiogénesis y crecimiento axonal (Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998). También está implicado en la colonización de la médula ósea por progenitores hematopoyéticos (Ara et al., 2003; Egawa et al., 2001). Esta quimioquina juega además un papel esencial como quimioatrayente para linfocitos y monocitos, regulando los procesos de recirculación y homeostasis inmunológica. Aún siendo una quimioquina homeostática, su expresión puede alterarse mediante varios estímulos como factores solubles, quimioquinas o adhesión a células estromales (Wright et al., 2002). El receptor de CXCL12, denominado CXCR4, se expresa en una amplia variedad de células (Bleul et al., 1996a; Oberlin et al., 1996; Peled et al., 1999). Recientemente se ha descrito un nuevo receptor para CXCL12, denominado CCX-CKR2 o CXCR7 (Balabanian et al., 2005). Este receptor es capaz de unir también a la quimioquina CXCL11 y se expresa esencialmente en células tumorales afectando su supervivencia, adhesión y crecimiento.

Las quimioquinas CCL19, CCL21 y su receptor CCR7

Las quimioquinas homeostáticas CCL19 y CCL21 comparten el receptor común CCR7 (Schweickart et al., 1994). Ambas quimioquinas son diferentes estructuralmente, aunque las dos resultan esenciales para el *homing* de linfocitos y células dendríticas a ganglios (Nagira et al., 1998). CCL21, gracias a su capacidad de unirse a proteoglicanos y de expresarse por células endoteliales linfáticas, parece tener una mayor implicación en estos procesos (Proudfoot et al., 2003). Se ha apuntado que los diferentes patrones de expresión de ambas quimioquinas podrían conferir distintas funciones a cada una de ellas (Zlotnik, 2004).

LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA B (LLC-B)

La leucemia linfocítica crónica de tipo B (LLC-B) es la leucemia más frecuente del adulto en los países occidentales, representando alrededor del 30% de todas las neoplasias de tipo B. La edad media de los pacientes al diagnóstico es de 65 años, con <15% por debajo de los 50, y suele ser más frecuente en varones (1.5:1) (Kay et al., 2002). Se trata de una neoplasia con curso muy heterogéneo. Las células de la LLC se asemejan morfológicamente a linfocitos maduros de la sangre periférica que se

acumulan progresivamente en la médula ósea, sangre, ganglios linfáticos y bazo (Chiorazzi et al., 2005b). El fenotipo característico de estas células linfoides tumorales consiste en la diferente expresión de una serie de proteínas que las diferencia de otros tipos de linfocitos B (**Figura 9**). La mayoría de las células se hallan en la fase G0 del ciclo celular, lo que corrobora que la LLC es más una enfermedad linfoacumulativa por un bloqueo de la apoptosis, que linfoproliferativa.

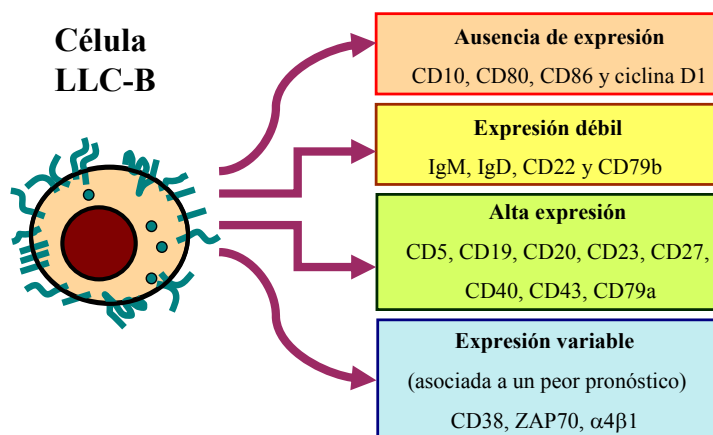


Figura 9. Principales marcadores de diagnóstico en la LLC-B. Las células LLC-B tienen una expresión alterada de diversos marcadores característicos que permiten diferenciarla de otras linfocitosis.

1.- ORIGEN DE LA ENFERMEDAD

Recientes estudios han caracterizado una pequeña población clonal de linfocitos B en todos los individuos con características de LLC-B (Linnet et al., 2007). Sin embargo, el paso que genera la evolución de linfocitos B normales a leucémicos, aún no ha sido definido. Una de las hipótesis se basa en la transformación sufrida por linfocitos B normales, al producirse alguna mutación (inducida o no) debido a la exposición repetida a antígenos extraños, o autoantígenos. Esta idea podría explicar el desarrollo de LLC-B del tipo no mutado en los genes V (Caligaris-Cappio and Ghia, 2008). De modo similar, otra hipótesis defiende el desarrollo de linfocitos LLC-B con mutaciones en los genes V, a partir de su expansión clonal sin estimulación de linfocitos T y fuera de los sitios germinales, lo que suele conllevar autorreactividad (Caligaris-Cappio, 1997; Chiorazzi et al., 2005b). Una última hipótesis defiende la procedencia de las células LLC-B a partir de precursores B1 con reactividad por autoantígenos, siendo capaces de expandirse en médula ósea, o de pasar a la sangre circulante y resto de tejidos.

También existen factores de ambiente extracelular que pueden promover la expansión de las células tumorales, como es el caso de la adhesión a estroma, la interacción de

CD38 con su ligando CD31, o la activación con quimioquinas y citoquinas tales como IL-4, VEGF o CXCL12 (Chiorazzi et al., 2005b; Ghia and Caligaris-Cappio, 2000). Todas ellas activan señales intracelulares en las células malignas que las lleva a proliferar o escapar de la apoptosis.

Por último, el desarrollo de la enfermedad conlleva un defecto en el sistema inmune. Las células NK y las células dendríticas son funcionalmente deficientes. Debido a la baja capacidad presentadora antigénica de los linfocitos B leucémicos, se puede llegar a producir una anergia de linfocitos T, o diferenciarse a linfocitos tipo Th-2 incrementando la síntesis de IL-4 y favoreciendo de este modo la supervivencia de células LLC-B. Además, la polarización a tipo Th-2 también reduce la capacidad citolítica de los linfocitos T, lo que favorece la progresión tumoral (Schena et al., 1992).

2.- DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN

El diagnóstico de la LLC-B se basa en la presencia de ≥ 5000 linfocitos por mm^3 , que expresan los marcadores característicos de estas células malignas como CD23 y CD5. También se analiza la presencia de mutaciones cromosómicas específicas de LLC-B mediante FISH (hibridación in situ fluorescente) (Kay et al., 2002).

Existen diferentes estadios de la LLC-B que se clasifican según los criterios de Rai y/o de Binet (Binet et al. 1981; Rai et al. 1975). Así hay un estadio de la enfermedad temprano (Rai 0, Binet A), intermedio (Rai I/II, Binet B) y avanzado (Rai III/IV, Binet C) (**Figura 10**).

Clasificación	Estadio	Diagnóstico
Rai	0	Linfocitosis en sangre periférica
	I	Linfocitosis y adenopatías
	II	Linfocitosis y hepato y/o esplenomegalia
	III	Linfocitosis y anemia
	IV	Linfocitosis y trombopenia
Binet	A	<3 Regiones afectadas sin anemia
	B	>3 Regiones afectadas sin anemia
	C	Anemia y/o trombopenia

Figura 10. Clasificación de la LLC-B. Estadios clínicos y clasificación según Rai (utiliza números para indicar categorías de bajo, intermedio y alto riesgo) o Binet (utiliza letras para clasificar de acuerdo al número de órganos afectados y si presenta o no una disminución en los glóbulos rojos o en las plaquetas).

Además de las clasificaciones mencionadas, se tiende a distinguir dos grupos distintos de LLC-B, dependiendo de su mejor o peor pronóstico y su necesidad de tratamiento. De este modo, pacientes con alta expresión de CD38 y/o ZAP70, o con menos de 2 mutaciones en los reordenamientos V_H tienen un pronóstico peor y más agresivo (Chiorazzi et al., 2005a). Recientemente se ha descrito que la expresión elevada de la integrina $\alpha 4\beta 1$ correlaciona con estos marcadores y con un peor pronóstico de la enfermedad (Nuckel et al., 2009; Pittner et al., 2005).

3.- MIGRACIÓN E INVASIÓN DE CÉLULAS LLC-B

3.1 Angiogénesis durante la LLC-B

Se ha descrito una vascularización aumentada en la médula ósea y ganglios de pacientes con LLC-B. El incremento de vascularización permite un mayor aporte de flujo sanguíneo que favorece la diseminación celular. Para este efecto, las células LLC-B son capaces de producir diversos factores proangiogénicos como VEGF y bFGF (Chen et al., 2000; Gora-Tybor et al., 2005; Molica, 2001; Smolej et al., 2005). Existe además una correlación entre el estadio de la enfermedad y los niveles de VEGF presentes en el suero de pacientes (Kay, 2004; Smolej et al., 2005).

3.2 Citoesqueleto de células LLC-B

Dentro de las estructuras con las que una célula es capaz de anclarse a la MEC se encuentran los contactos focales, adhesiones focales, fibrillas focales, podosomas e invadopodia (Gimona and Buccione, 2006). Tanto los podosomas como los invadopodia, están formados por un núcleo de actina y otras proteínas asociadas, todo ello rodeado por un anillo estructural formado por otras proteínas de citoesqueleto, como vinculina y talina (Linder and Aepfelbacher, 2003). Las principales diferencias entre podosomas e invadopodia son el origen celular donde se expresan cada uno, el tamaño de los núcleos de actina y el número de los mismos en la superficie celular (Yamaguchi et al., 2006). La importancia de estos mecanismos de adhesión celular radica en servir como puntos de anclaje o de secreción de numerosas metaloproteinasas, con la consiguiente degradación de la MEC (Bourguignon et al., 1998; Nakahara et al., 1997). Este último aspecto permite a la célula tumoral controlar el lugar exacto de degradación de la MEC. Las células LLC-B, al contrario que los linfocitos B normales, son capaces de formar podosomas en ausencia o presencia de ésteres de forbol, por lo que el estudio de estas estructuras y su asociación con MMPs es fundamental para analizar el papel de estas

proteasas en la patogénesis de la enfermedad. Se han descrito varias proteínas asociadas a los podosomas de células LLC-B, como vinculina, talina y las integrinas $\beta 2$ (en el anillo que rodea la actina) e integrinas $\beta 1$ (en el centro del anillo) (Caligaris-Cappio et al., 1986; Marchisio et al., 1988). También se ha propuesto un posible papel regulador de CD5 y CD21 que afectaría al ensamblaje de los podosomas en estas células tumorales (Bergui et al., 1988).

3.3 Quimioquinas y LLC-B

Las células de LLC-B expresan diversos receptores de quimioquinas entre los que se encuentran CXCR4, CXCR5 y CCR7 (Lopez-Giral et al., 2004). Estos receptores son plenamente funcionales, induciendo señales intracelulares que promueven la migración y supervivencia de las células leucémicas (Alfonso-Perez et al., 2006; Burger et al., 1999; Mohle et al., 1999). Se ha descrito que ZAP-70 potencia la señalización inducida por los receptores de quimioquinas y sus efectos funcionales en células LLC-B (Richardson et al., 2006; Tichioni et al., 2002). Además los niveles de expresión de alguno de estos receptores de quimioquinas, o los niveles de determinadas citoquinas presentes en el suero de los pacientes (IL-8, IL-10, sCD27) correlacionan con el estadio de la enfermedad y la presencia de adenopatías (Ghobrial et al., 2004; Kara et al., 2007).

3.4 Moléculas de adhesión y LLC-B

Las células LLC-B expresan varias integrinas (De Rossi et al., 1993; Vincent et al., 1996). Mientras la subunidad $\beta 1$ está constitutivamente presente, la expresión de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ es variable; además $\alpha 4\beta 7$ y $\alpha L\beta 2$ se encuentran a menudo expresadas, mientras que $\alpha V\beta 3$ se encuentra ausente (Baldini and Cro, 1994; Gattei et al., 2008). Además las células de LLC-B expresan también L-selectinas de forma variable e inducible por las citoquinas IL-4 e interferones (Jewell and Yong, 1997). Las células LLC-B expresan altos niveles del receptor CD44, tanto la forma estándar CD44H como la variable CD44v (De Rossi et al., 1993; Zarcone et al., 1998). Además se ha observado que pacientes con altos niveles de CD44 soluble en suero presentan un peor pronóstico de la enfermedad (De Rossi et al., 1997; Eisterer et al., 2004).

La movilidad de las células de LLC-B depende en gran medida de estas moléculas de adhesión. La integrina $\alpha 4\beta 1$ es necesaria para la movilidad quimio-dependiente de las células LLC-B o su migración transendotelial, pero no otras integrinas como $\alpha L\beta 2$, que sí es necesaria en la migración de linfocitos B normales (Till et al., 2005). La integrina

$\alpha 4\beta 1$ y la estimulación con quimioquinas juegan un papel fundamental en la activación de la integrina $\alpha L\beta 2$ y la GTPasa Rap1 en procesos de migración de células LLC-B (Till et al., 2008). Se ha demostrado que las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ son necesarias para la migración transendotelial bajo condiciones de flujo, y además $\alpha 4\beta 1$ es indispensable para la migración de las células LLC-B a la médula ósea (Hartmann et al., 2009).

3.5 Metaloproteinasas de matriz y LLC-B

Estudios previos han demostrado que las células LLC-B son capaces de producir y secretar la metaloproteinasa MMP-9, aunque no se ha detectado la presencia de otras proteínas relacionadas como MMP-2 ó TIMP-1 (Bauvois et al., 2002). MMP-9 se encuentra en células LLC-B en sus formas monomérica, dimérica, unida a lipocalina, o asociada a la membrana celular. Niveles elevados de MMP-9 intracelular o presente en el suero de pacientes de LLC-B correlacionan con estadios avanzados de la enfermedad y un mal pronóstico (Molica et al., 2003). Además, la inhibición de la actividad enzimática de MMP-9 reduce la migración a través de colágeno de tipo IV o de monocapas de células endoteliales (Kamiguti et al., 2004). El tratamiento con interferones, o el bloqueo del VEGF y TNF- α endógeno de las células LLC-B disminuye la síntesis de MMP-9 por estas células (Bauvois et al., 2002). La expresión constitutiva de MMP-9 en células LLC-B parece estar regulada por la señalización a través de la p38MAPK, y la inhibición de esta ruta reduce la expresión de la metaloproteinasa (Ringshausen et al., 2004). Estos resultados inducen a pensar en el potencial papel de MMP-9 en los procesos de migración y remodelación de la MEC por células LLC-B.

4.- APOPTOSIS EN CÉLULAS LLC-B

Las células LLC-B tienen constitutivamente una señalización celular muy alterada con respecto a linfocitos B normales, presentando por ejemplo niveles elevados de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Caligaris-Cappio et al., 1993; Gottardi et al., 1995). Las células LLC-B también tienen constitutivamente activada la ruta PI3K/Akt y p38MAPK y su inhibición promueve la apoptosis celular (Barragan et al., 2003; Escobar-Diaz et al., 2005; Ringshausen et al., 2004). Recientemente se ha observado que Notch está constitutivamente activo en células LLC-B contribuyendo a su supervivencia (Rosati et al., 2009). Las células LLC-B son capaces de unir a través de sus receptores de membrana distintas moléculas que inducen su supervivencia. Es el

caso de la unión a las quimioquinas CXCL12, CCL19, CCL21, CXCL13, las citoquinas IL-4 y VEGF, los factores BAF y APRIL, de la señalización a través del BCR o del receptor CD40. En todos los casos, estas activaciones promueven señales intracelulares (como la activación de PKC o PI3K) que inducen la expresión de proteínas antiapoptóticas como survivina, Bcl-xL, Bcl-2, XIAP o Mcl-1 (Granziero et al., 2001; Hu et al., 2004a; Jewell and Yong, 1997; Kitada et al., 1999; Ticchioni et al., 2007). Se ha descrito que las células de LLC-B tienen alterada la señalización por quinasas de la familia Src, como Lyn y Lck, y que ello promueve supervivencia (Contri et al., 2005; Majolini et al., 1998). La adhesión a células estromales o a endotelio, bien en reposo (a través de la unión ICAM-1/integrinas $\beta 2$) o bien activado (a través de VCAM-1/integrina $\alpha 4 \beta 1$) incrementa los niveles de supervivencia (Lagneaux et al., 1999). En general la adhesión a células estromales favorece la supervivencia de células LLC-B a través de la inducción de Mcl-1 (Balakrishnan et al., 2009). La adhesión de células LLC-B a proteínas de la matriz extracelular también promueve la supervivencia de las células LLC-B o su resistencia a tratamientos farmacológicos al aumentar los niveles de diversas proteínas antiapoptóticas (de la Fuente et al., 1999; de la Fuente et al., 2002).

Por tanto, el microambiente en el que se encuentra la célula LLC-B favorece la supervivencia de las mismas a través de señales mediadas por moléculas solubles, adhesión a diferentes sustratos, o inducción de proteínas antiapoptóticas (Ghia and Caligaris-Cappio, 2000; Smit et al., 2007).

5.- MODELOS ANIMALES DE LA ENFERMEDAD

Varios estudios se han llevado a cabo desarrollando animales que asemejen las características de LLC-B y sirvan para estudiar esta enfermedad y probar nuevos agentes quimioterapéuticos (Michie et al., 2007). Uno de estos modelos, hecho en la cepa de ratón negro de Nueva Zelanda (NZB), se basa en la hiperproliferación de células B y conlleva autoinmunidad y progresión a estadio de LLC-B (Okamoto et al., 1993). Otros modelos se basan en el silenciamiento de diversas proteínas como PKC α y produce una expansión clonal de linfocitos B con marcadores similares a los de las células LLC-B humanas (Nakagawa et al., 2006). Otros modelos se basan en la sobreexpresión de protooncogenes, como ocurre con el ratón TCL-1 (*T-cell leukemia-1*), o el ratón basado en la sobreexpresión del antígeno SV40 en linfocitos B maduros, que les confiere un fenotipo de LLC-B (ter Brugge et al., 2009).

Objetivos

El objetivo general de esta tesis ha sido **caracterizar el papel de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) en la fisiopatología de la leucemia linfocítica crónica B**, con el fin de poder establecer futuras dianas terapéuticas.

Objetivos concretos:

- 1.- Caracterizar el patrón de expresión de MMPs en células de LLC-B así como su posible papel en la migración e invasión de estas células tumorales.
- 2.- Estudiar la regulación de la expresión de MMP-9 por diversos estímulos relevantes en la LLC-B, como la interacción de la integrina $\alpha 4\beta 1$ o de los receptores de quimioquinas CXCR4 y CCR7 con sus respectivos ligandos.
- 3.- Analizar las asociaciones moleculares de MMP-9 en la membrana de células LLC-B y las consecuencias funcionales subsiguientes a esta localización. Comparación con las funciones de la MMP-9 soluble.

Materiales y Métodos

Los materiales y métodos empleados en esta tesis doctoral están detallados en los artículos presentados en la misma.

Resultados

La metaloproteinasa MMP-9 está regulada en células LLC-B por la ligación de la integrina $\alpha 4\beta 1$ ó el receptor CXCR4 a través de diferentes señales intracelulares, se localiza en podosomas y está implicada en la migración e invasión celular.

La progresión de la leucemia linfocítica crónica B, está determinada por la extravasación de células tumorales y la progresiva infiltración de tejido linfoide. Nuestro estudio se ha centrado en el papel y regulación de la metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9) en la migración e invasión de células LLC-B.

La adhesión de células LLC-B al fragmento de fibronectina FN-H89, a VCAM-1 o a células endoteliales procedentes de cordón umbilical (HUVEC) activadas con TNF- α , aumenta la producción de MMP-9 medida mediante zimografía. Este efecto está mediado por la integrina $\alpha 4\beta 1$ y requiere la activación de la ruta de señalización PI3K/Akt.

La quimioquina CXCL12 también incrementa la producción de MMP-9, de un modo completamente independiente de la integrina $\alpha 4\beta 1$, y que implica la actividad de Erk1, 2 pero no la ruta de Akt. De acuerdo con estos resultados, la ligación de la integrina $\alpha 4\beta 1$ activa la ruta de PI3K/Akt/NF- κ B, mientras que la interacción del receptor CXCR4 con CXCL12 activa la señalización mediada por Erk1, 2 y c-fos.

Por otro lado, la inhibición de la actividad de MMP-9, mediante anticuerpos, su inhibidor natural TIMP-1, o la transfección con 3 siRNAs diferentes bloquean de forma significativa la migración de células LLC-B a través de Matrigel o células HUVEC. La localización celular de MMP-9 es principalmente en la membrana, donde se detecta tanto la proforma como la enzima activa. Además, las células LLC-B son capaces de formar podosomas al adherirse a FN-H89, VCAM-1 o fibronectina. MMP-9 se localiza en los podosomas de forma dependiente de PI3K y es capaz de degradar una matriz de fibronectina/gelatina. Estos resultados son los primeros en mostrar que MMP-9 está regulada fisiológicamente por la integrina $\alpha 4\beta 1$ y por CXCL12 y juega un papel fundamental en la invasión celular y la migración transendotelial, lo que contribuye a la progresión de la enfermedad. MMP-9 puede constituir por tanto una posible diana para el tratamiento de esta enfermedad.

Redondo-Muñoz J, Escobar-Díaz E, Samaniego R, Terol MJ, García-Marco JA, García-Pardo A. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3143-51.

La metaloproteinasa de matriz-9 está regulada positivamente por la interacción CCL21/CCR7 a través de la señalización de la quinasa regulada por señales extracelulares-1, 2 (Erk1, 2) y está implicada en la migración e invasión de las células LLC-B dependiente de la quimioquina CCL21.

La progresión de la leucemia linfocítica crónica B está frecuentemente acompañada por la presencia de linfadenopatías clínicas y la quimioquina CCL21 podría jugar un importante papel en este proceso tumoral. De hecho, CCR7 (el receptor de CCL21) así como la metaloproteinasa de matriz-9, se encuentran sobreexpresados en células LLC-B infiltradas. Nosotros hemos estudiado si MMP-9 se encuentra regulada por CCL21 y si participa en la migración celular inducida por CCL21.

CCL21 incrementa significativamente la producción de MMP-9, medida a través de zimografía de gelatina. Este incremento puede ser inhibido bloqueando la actividad de Erk1, 2, o mediante la transfección de siRNAs específicos para el receptor CCR7. De acuerdo con esto, la interacción entre CCL21 y su receptor CCR7 induce la activación de la ruta Erk1, 2/c-fos así como un aumento en el RNA mensajero de MMP-9.

La migración de células LLC-B a través de Matrigel o de células endoteliales de las venas de cordón umbilical (HUVEC) inducida por CCL21 puede ser bloqueada por anticuerpos anti-CCR7, el silenciamiento de CCR7 por transfecciones con siRNA, el inhibidor químico de Erk1, 2 (UO126) así como por anticuerpos anti-MMP-9 o el inhibidor en tejidos de metaloproteinasas-1 (TIMP-1). Estos resultados refuerzan la idea de que MMP-9 está implicada en la infiltración de células LLC-B a nódulos linfáticos y amplía el papel de MMP-9 y CCR7 en la progresión de este tipo de leucemia. Ambas moléculas pueden constituir por tanto posibles dianas terapéuticas en el tratamiento de esta enfermedad.

Redondo-Muñoz J, José Terol M, García-Marco JA, García-Pardo A. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):383-6.

La integrina $\alpha 4\beta 1$ y la isoforma de 190-kDa CD44v constituyen un complejo de anclaje en la superficie celular para la gelatinasa B/MMP-9 en células de leucemia linfocítica crónica B, pero no en células B normales.

Durante la progresión de la leucemia linfocítica crónica B (LLC-B) las células tumorales son capaces de extravasar e infiltrar tejidos linfoides. Varias moléculas, incluida la gelatinasa B/MMP-9, contribuyen a estos procesos. Aunque principalmente se trata de una proteasa secretada, parte de la MMP-9 se encuentra presente en la superficie de las células LLC-B y su función, modo de anclaje, y posibles interacciones de esta MMP-9 son hasta el momento desconocidas.

En este trabajo, nosotros mostramos como anticuerpos específicos anti-MMP-9 son capaces de inmunoprecipitar en células LLC-B, pero no en células B normales, una isoforma de CD44v de 190 kDa y la integrina $\alpha 4\beta 1$. El uso de anticuerpos bloqueantes de la integrina $\alpha 4\beta 1$ o CD44, o la transfección con siRNAs específicos, disminuye la proporción de MMP-9 asociada a la membrana celular e incrementa la de la forma secretada. Además las células LLC-B son capaces de adherirse o unir tanto la proforma como la forma activa de MMP-9, y esta unión puede inhibirse mediante el bloqueo de la expresión o la función de $\alpha 4\beta 1$ y CD44. El dominio hemopexina de MMP-9 es indispensable para estas interacciones.

$\alpha 4\beta 1$ y la isoforma CD44v de 190 kDa (pero no la isoforma CD44H) forman un complejo en la superficie celular ya que ambos son capaces de coimmunoprecipitar con anticuerpos frente a CD44, la subunidad $\alpha 4$, o la subunidad $\beta 1$. Además análisis por inmunofluorescencia confirman que la integrina $\alpha 4\beta 1$ y CD44v colocalizan con MMP-9 en la membrana celular. El anclaje de (pro)MMP-9 inhibe la migración de células LLC-B, y para llevar a cabo esta función MMP-9 necesita su actividad catalítica. Por tanto, hemos identificado a la integrina $\alpha 4\beta 1$ y CD44v como un nuevo complejo de anclaje de MMP-9 a la superficie celular, y hemos mostrado como la asociación de MMP-9 a la superficie celular puede regular y/o detener la migración de células LLC-B.

Redondo-Muñoz J, Ugarte-Berzal E, García-Marco JA, del Cerro MH, Van den Steen PE, Opdenakker G, Terol MJ, García-Pardo A. *Blood*. 2008 Jul 1;112(1):169-78.

La metaloproteína de matriz-9 (MMP-9) induce supervivencia en células de LLC-B a través de su dominio hemopexina

La metaloproteasa de matriz-9 (MMP-9) es la principal MMP producida por las células de leucemia linfocítica crónica (LLC-B) y contribuye a la infiltración en tejidos de estas células tumorales degradando sustratos extracelulares o asociados a membrana. En este trabajo describimos una nueva función para MMP-9 que no requiere su actividad catalítica. La unión de (pro)MMP-9 soluble o inmovilizada, de un mutante sin actividad catalítica, o del dominio hemopexina de proMMP-9 a su complejo de anclaje en membrana formado por la integrina $\alpha 4\beta 1$ y CD44v induce una señalización intracelular que previene la apoptosis de células LLC-B. Esta ruta de supervivencia se induce en todos los casos de LLC-B estudiados, es activa en tejidos linfoides de LLC-B, y consiste en la activación de Lyn, fosforilación del factor de transcripción STAT3 y el aumento de la expresión de la proteína anti-apoptótica Mcl-1. Nuestros resultados establecen que la unión de una MMP a un receptor induce señales intracelulares de supervivencia y ponen de relieve el papel de MMP-9 en la patogénesis de la LLC-B.

Redondo-Muñoz J, Ugarte-Berzal E, Terol MJ, Van den Steen PE, Hernández del Cerro M, Roderfeld M, Roeb E, Opdenakker G, García-Marco JA, García-Pardo A. *Cancer Cell*. 2010 Feb 17;17(2):160-72.

Discusión

La LLC-B, se basa en la acumulación de células B malignas en sangre, así como la posterior colonización e infiltración de estas células a ganglios, médula ósea, bazo, y otros tejidos que actúan como focos de metástasis. En el momento de comenzar la tesis, se había descrito la producción de MMP-9 por células de LLC-B (Bauvois et al., 2002), y cómo esta proteasa parecía tener un papel importante durante el transcurso de la enfermedad, ya que niveles elevados de MMP-9 en suero o intracelulares podían relacionarse con estadios avanzados y/o un peor pronóstico (Kamiguti et al., 2004; Molica et al., 2003). Además, con vistas a un futuro tratamiento de la LLC-B se había apuntado un posible papel de MMP-9 en la migración a través de células endoteliales HUVEC (Kamiguti et al., 2004), así como la posibilidad de que esta proteasa tuviera efectos antiapoptóticos en estas células (Ringshausen et al., 2004). También se había descrito que el tratamiento con interferones disminuye la síntesis de MMP-9 por células LLC-B (Bauvois et al., 2002).

Con estos antecedentes nos planteamos profundizar en el estudio de MMP-9 en la LLC-B, con el fin de esclarecer los mecanismos que la regulan, así como estudiar sus posibles funciones. Nuestros primeros datos, confirmaron que las células de LLC-B son capaces de secretar proMMP-9 al medio extracelular, y que dichos niveles son mucho mayores que los secretados por linfocitos B no leucémicos. Además, y a diferencia con otro tipo de enfermedades como el mieloma (Parmo-Cabanas et al., 2006; Vacca et al., 1999), nuestros resultados demuestran que MMP-9 es la principal metaloproteínasa presente en células de LLC-B, ya que no observamos la presencia de otras proteasas solubles como MMP-2, ni ancladas a membrana, como MT1-MMP. Recientemente se ha descrito que MT1-MMP puede permanecer en el citoplasma, e incluso el núcleo, de células tumorales (Ip et al., 2007). No es por tanto descartable que en la LLC-B MT1-MMP esté llevando a cabo alguna posible función intracelular, o reguladora en membrana con niveles prácticamente indetectables.

Dado que las señales que inducen la migración e invasión de los linfocitos, se basan fundamentalmente en la activación por quimioquinas así como en la adhesión mediada por receptores linfocitarios, hemos estudiado como afectaban estos estímulos a la producción de MMP-9. Trabajos previos apuntaban el posible papel de la integrina $\alpha 4 \beta 1$ en la progresión de la LLC-B, al relacionar su expresión elevada con la aparición de linfadenopatías (Till et al., 2002; Till et al., 2005; Zucchetto et al., 2006).

Nuestros resultados indican que la adhesión de células LLC-B a ligandos de la integrina $\alpha 4 \beta 1$ (FN, VCAM-1) aumenta la producción de proMMP-9. Hemos identificado la ruta de PI3K/Akt/NF- κ B como única responsable de dicha sobreproducción. Aunque otros autores han sugerido un papel de p38MAPK durante la expresión constitutiva de MMP-9 en células LLC-B (Ringshausen et al., 2004), nosotros no hemos observado ningún efecto al tratar las células con inhibidores específicos para esta ruta. Probablemente esta discrepancia se deba a diferencias metodológicas. Estudios previos han mostrado que en linfocitos T, la adhesión a FN a través de la integrina $\alpha 4 \beta 1$ aumenta los niveles de MMP-9 a través de las rutas PI3K/Akt, p38MAPK y Erk (Esparza et al., 1999). Ésto indica que dependiendo del tipo celular las rutas de señalización activadas por la integrina $\alpha 4 \beta 1$ podrían ser diferentes. Los niveles de proMMP-9 observados en nuestro estudio son debidos a un aumento en la síntesis de la metaloproteinasa, ya que el tratamiento con cicloheximida bloquea este incremento. Nuestros datos sugieren que la fosforilación y posterior degradación del factor I κ B permite la liberación y transporte al núcleo del factor de transcripción NF- κ B (**Figura 11**). El promotor de MMP-9 contiene un sitio de unión a NF- κ B y se ha descrito previamente que este factor es uno de los activadores fundamentales de la transcripción de MMP-9 (Van den Steen et al., 2002). Recientemente un estudio mediante *microarrays* ha demostrado que la expresión de MMP-9 aumenta cuando las células LLC-B se cultivan sobre estroma (Edelmann et al., 2008). En paralelo, también están sobreexpresados Akt y NF- κ B, lo que apoya nuestros resultados. Por tanto, nuestros datos esclarecen por primera vez la señalización inducida por la integrina $\alpha 4 \beta 1$ en la LLC-B y su papel en la patogénesis de esta enfermedad.

Aunque $\alpha 4 \beta 1$ es una de las integrinas mayoritarias en células LLC-B, $\alpha 3 \beta 1$ y $\alpha L \beta 2$ también están expresadas. En el caso de $\alpha L \beta 2$, se ha descrito su capacidad para regular la migración de células LLC-B (Till et al., 2008). Sin embargo, aunque hemos analizado su implicación con respecto a MMP-9, ninguno de los ligandos de estas otras integrinas aumenta la producción de MMP-9. Estos resultados indican que estas integrinas probablemente regulan la migración celular por mecanismos independientes de MMP-9, que podrían implicar a las RhoGTPasas, o dirigir migración en eventos más tempranos de la enfermedad. De este modo la invasión en eventos tardíos, o a determinados nichos metastáticos podría estar dirigida por la integrina $\alpha 4 \beta 1$, como se ha descrito recientemente (Nuckel et al., 2009). Por tanto el papel de una u otra integrina en la

migración de células LLC-B podría depender del momento en que se encuentre la célula, o de poseer un fenotipo más o menos invasivo.

Otro dato que refuerza la hipótesis de un papel fundamental de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en la malignidad de las células LLC-B es el hecho de que son capaces de formar podosomas (estructuras invasivas) sobre ligandos de esta integrina. Los podosomas son estructuras de anclaje de la célula con la ECM donde se localizan, entre otras proteínas, proteasas del tipo MMP (Linder, 2007). Previamente se había descrito la formación de podosomas en células LLC-B sobre cristal (Caligaris-Cappio et al., 1986), sin embargo no se había estudiado su posible papel como efector invasivo de estas células. Nuestros datos demuestran que la integrina $\alpha 4\beta 1$ induce la formación de podosomas y que MMP-9 se localiza en el núcleo de actina de estas estructuras. Además la presencia de podosomas correlaciona con la capacidad de degradar la MEC, lo que demuestra su papel como estructuras invasivas. MMP-9 es la responsable de esta degradación, ya que su inhibición mediante anticuerpos bloqueantes o el inhibidor TIMP-1 la bloquea por completo. Estos resultados abren una nueva vía terapéutica, ya que los linfocitos B normales no forman podosomas, y si consiguiéramos encontrar proteínas, marcadores, o mecanismos que diferencien a estos podosomas, de los de otros tipos celulares como los macrófagos u osteoclastos, podríamos bloquear la formación de podosomas de forma específica. Otra posible terapia podría ser evitar la presencia de MMP-9 en los mismos, inhibiendo la ruta de PI3K. Hemos demostrado que la ruta de PI3K es necesaria para la localización de MMP-9 en los podosomas, lo que fortalece el papel de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en la biología de MMP-9, no sólo regulando su producción, sino también su localización celular y su funcionalidad. En ambos casos, el bloqueo de la formación de podosomas y/o la localización de MMP-9 en los mismos, podría servir por tanto para disminuir la capacidad invasiva de las células LLC-B.

En cuanto a la activación por quimioquinas, tanto el receptor CCR7 como el CXCR4 están presentes en las células LLC-B, son funcionales y dirigen la migración celular a ganglios y médula ósea en respuesta a sus ligandos (Ghobrial et al., 2004). Nuestros resultados son pioneros en demostrar que la activación de ambos receptores a través de sus respectivos ligandos aumenta la producción de proMMP-9 por células LLC-B. Este incremento de una MMP debido a la estimulación con quimioquinas es similar al observado en otros tipos celulares (Brand et al, 2005; Opdenakker et al., 2001). El aumento de proMMP-9 por quimioquinas en células LLC-B es debido a su síntesis *de*

novo e implica la ruta de Erk1, 2 MAPK, en contraposición con la regulación de MMP-9 por ligandos de $\alpha 4\beta 1$. La activación de Erk por quimioquinas es bien conocida (Ganju et al., 1998). Nosotros hemos demostrado que la activación de Erk conlleva un aumento en la expresión de c-fos, factor de transcripción que junto con Jun forman el complejo AP-1 (**Figura 11**). El promotor de MMP-9 posee dos regiones de unión para este complejo transcriptor (Westermarck, and Kahari, 1999), lo que indica que el aumento de proMMP-9 es debido a una mayor transcripción, como nuestros resultados también demuestran. Actualmente se están llevando a cabo estudios inhibiendo la ruta de señalización de ambos receptores con inhibidores farmacológicos y péptidos o anticuerpos bloqueantes, con el fin de promover apoptosis en estas células tumorales (Alfonso-Perez et al., 2006; Burger et al., 2005). Sería interesante comprobar también su posible efecto en el aspecto migratorio e invasivo de estas células.

Por otro lado, las células LLC-B son capaces de expresar otros receptores de quimioquinas como CXCR5, el cual a su vez induce señales intracelulares e incluso dirige la migración de estas células (Burkle et al., 2007). No se debe descartar el posible efecto de otras quimioquinas en la producción de MMP-9 en células LLC-B, por lo que resultaría interesante comprobarlo y estudiar las rutas de señalización implicadas.

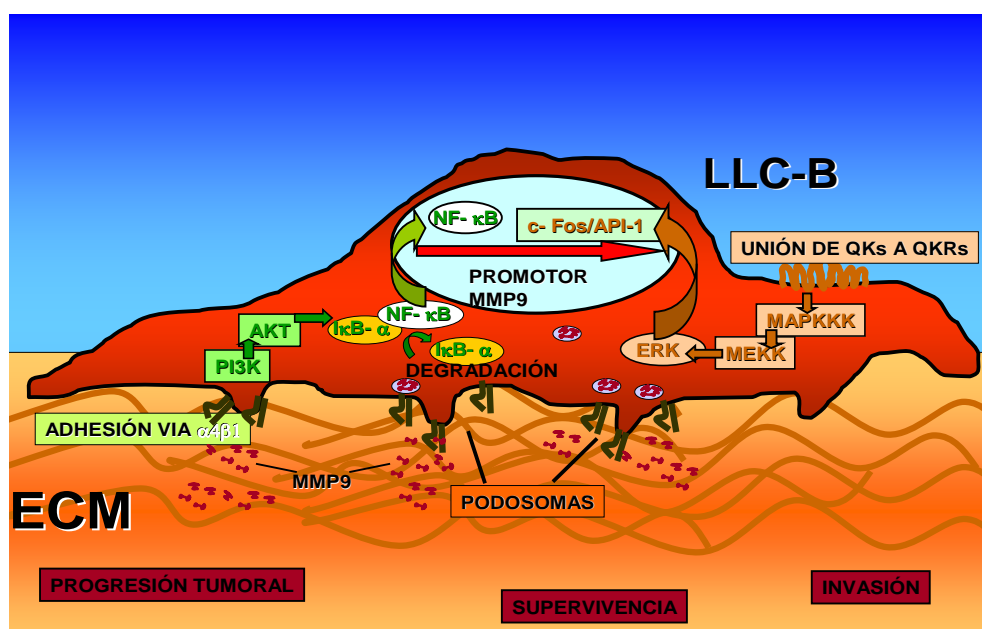


Figura 11. Regulación de la expresión de MMP-9 en células LLC-B. Las células LLC-B son capaces de incrementar la producción de MMP-9 en respuesta a su adhesión a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$ siguiendo la ruta de PI3K y Akt. Asimismo la estimulación de los receptores de quimioquinas CXCR4 y CCR7 también induce MMP-9 siguiendo la ruta de las MAPKs Erk1, 2.

Trabajos previos a esta tesis habían apuntado la presencia de MMP-9 en la membrana de células LLC-B (Kamiguti et al., 2004). Nosotros hemos demostrado mediante fraccionamiento celular que tanto la proforma como la forma activa de MMP-9 están presentes en la membrana de células LLC-B. Sin embargo, y a pesar de que nuestros datos demuestran que la MMP-9 es proteolíticamente activa, en el medio extracelular únicamente se detecta la proforma de 92 kDa. Esto concuerda con lo observado por otros investigadores (Arechavaleta-Velasco et al., 2002; Leber and Balkwill, 1998) y podría deberse a que los niveles de MMP-9 activa son muchísimo menores a los de la proforma, aunque suficientes para llevar a cabo su función. Otra explicación podría ser que la activación de MMP-9 no sólo se produce en la membrana celular, sino además por autoproteólisis, cambios oxidativos del medio, o cambios conformacionales no proteolíticos, como se ha sugerido (Opdenakker et al., 2001). Por otro lado, se sabe que en otros tipos celulares el anclaje de MMP-9 a la membrana celular se puede producir a través de varios receptores (*docking receptors*) como por ejemplo la proteína Ku, CD44H o diversas integrinas (Monferran et al., 2004; Stefanidakis et al., 2004; Yu and Stamenkovic, 1999). Dado que este anclaje en la membrana se ha visto a menudo asociado a progresión tumoral o a situaciones patológicas, en esta tesis se ha estudiado en profundidad la asociación de MMP-9 a células LLC-B. Nuestros resultados demuestran que (pro)MMP-9 se une a células LLC-B a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$ y de una isoforma de alto peso molecular de CD44 (CD44v) que presenta varios exones variables, en contraposición con la isoforma estándar (CD44H). Aunque $\alpha 4\beta 1$ juega un papel fundamental en la progresión de la LLC-B, hasta ahora nadie había descrito a la integrina $\alpha 4\beta 1$ como posible molécula de anclaje para MMP-9. Por otro lado, hay evidencias que sugieren que CD44v podría estar implicado en invasión y mal pronóstico en diversos tipos de cánceres (Bourguignon et al., 1998). En este sentido, se ha visto que niveles elevados de CD44v en la superficie celular, o en el suero de pacientes con LLC-B correlaciona con un pronóstico más agresivo (Zarcone et al., 1998). Nuestros resultados son los primeros en establecer que la integrina $\alpha 4\beta 1$ y CD44v están asociados en la membrana de células LLC-B, y constituyen un nuevo complejo de anclaje para MMP-9 (**Figura 12**).

La capacidad de unir MMP-9 parece ser específica de las células LLC-B, ya que los linfocitos B normales, u otros linfocitos CD5⁺ procedentes de linfoma de manto o de amígdala, no la unen. Dado que todos estos tipos de linfocitos expresan la integrina

$\alpha 4 \beta 1$, así como CD44H, tal vez la diferencia radique en la expresión de CD44v en células LLC-B. Una caracterización más en profundidad de la isoforma CD44v y su función en estas células tumorales podría servir para establecer nuevos protocolos de diagnóstico y tratamiento de la LLC-B.

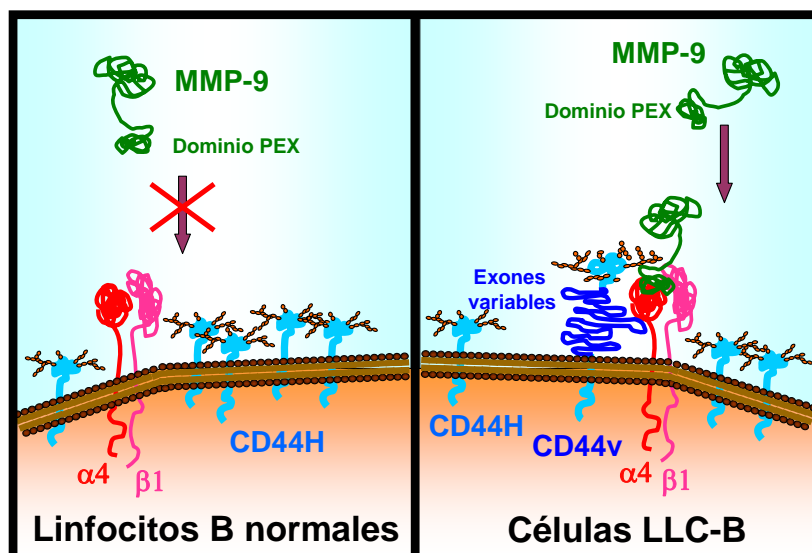


Figura 12. Anclaje de MMP-9 a la membrana de células LLC-B. Las células LLC-B, son capaces de anclar MMP-9 a su superficie celular a través de $\alpha 4 \beta 1$ /CD44v. Este complejo de anclaje es específico de células LLC-B y reconoce como ligando al dominio hemopexina (PEX) de MMP-9.

Hemos identificado también la región de (pro)MMP-9 implicada en su anclaje a la superficie celular. Utilizando proteínas recombinantes deplecionadas en diversas regiones, hemos demostrado que el dominio PEX9 (y en menor medida la región rica en azúcares O-glicosídicos) es fundamental para el reconocimiento de (pro)MMP-9 por el complejo $\alpha 4 \beta 1$ /CD44v (Figura 12). La región PEX9 no posee ninguna de las secuencias identificadas como ligandos de la integrina $\alpha 4 \beta 1$, por lo que es importante caracterizar los residuos implicados en el reconocimiento de la integrina. La identificación de estos residuos sería muy útil para el diseño de dianas terapéuticas. Además, la región PEX9 participa en la regulación de la migración celular, así como en el anclaje de MMP-9 a diversas integrinas (Brooks et al., 1998; Monaco et al., 2006). Por todo ello, es importante estudiar el posible papel del dominio PEX9 en células LLC-B, con el fin de determinar su implicación en esta patología.

Hemos estudiado las posibles consecuencias funcionales de la unión de MMP-9 a la superficie celular, centrándonos en dos aspectos: migración celular y supervivencia. Ambos aspectos son críticos para la progresión de la LLC-B. Dado que MMP-9 puede

activarse en la membrana celular, nosotros hemos estudiado si el estado de activación de MMP-9 es independiente de su capacidad de unirse a la superficie celular. Complejos de MMP-9 con su inhibidor TIMP-1, o una proteína recombinante conteniendo una mutación en su sitio catalítico que la hace proteolíticamente inactiva, son capaces de asociarse a la membrana celular igual que la forma activa o el zimógeno de MMP-9. Además hemos demostrado que MMP-9 se asocia por un lado a TIMP-1 y por el otro a la membrana celular, demostrando que no comparten la misma región de unión, y que es posible el anclaje de MMP-9 a la membrana celular y su posterior activación.

De forma sorprendente, el aumento de los niveles de MMP-9 en la membrana de células LLC-B se traduce en una inhibición tanto de la invasión a través de membranas basales, como de la migración transendotelial. Ésto estaría de acuerdo con lo observado en otros modelos celulares (Deryugina et al., 2005). De forma importante, nuestros resultados demuestran que el efecto inhibitorio observado requiere la capacidad proteolítica de la MMP-9. Es importante en un futuro caracterizar en profundidad a qué es debido este efecto inhibitorio de la migración. Como hipótesis, se puede pensar en la proteólisis de algún receptor necesario para la migración de células LLC-B; también a señales intracelulares inducidas por los receptores de MMP-9, o a la mayor capacidad de la MMP-9 unida a membrana para cortar e inactivar el gradiente de quimioquinas necesario para la migración de estas células tumorales. Hemos demostrado por tanto que la MMP-9 soluble y la asociada a células LLC-B parecen tener funciones opuestas en cuanto a regulación de la migración celular.

Con respecto a otras funciones de la MMP-9 asociada a la superficie celular, estudios anteriores han demostrado su papel en la supervivencia de varios tipos tumorales, como el carcinoma de pulmón de Lewis, de mama o la propia LLC-B (Acuff et al., 2006; Kunigal et al., 2008; Ringshausen et al., 2004) de forma dependiente a su actividad catalítica. En esta tesis hemos estudiado el posible papel de MMP-9 como inductor de supervivencia a través de la unión a sus receptores celulares $\alpha 4 \beta 1$ y CD44v. En primer lugar, hemos demostrado que las células cultivadas sobre proMMP-9 son más resistentes a la apoptosis espontánea debida a la privación de suero. Además, este efecto protector es similar al observado al cultivar las células LLC-B sobre ligandos “clásicos” de la integrina $\alpha 4 \beta 1$, como FN-H89 ó VCAM-1 (de la Fuente et al., 1999; de la Fuente et al., 2002). Por el contrario, la adhesión a ácido hialurónico (ligando de CD44) no ejerce el mismo efecto protector (resultados no mostrados). En segundo lugar,

y a diferencia del efecto de MMP-9 sobre la migración celular, nuestros resultados establecen que la inducción de supervivencia celular por MMP-9 es independiente de su actividad catalítica. De hecho, tanto proMMP-9, MMP-9 activa, el mutante catalíticamente inactivo de MMP-9, o el complejo MMP-9/TIMP-1 inducen niveles similares de supervivencia en células LLC-B.

Estos resultados están también corroborados por el hecho de que la región PEX9, que no tiene actividad catalítica y que, según nuestros datos, es fundamental para el anclaje de MMP-9 a la membrana celular, también induce supervivencia de células LLC-B. Además el cultivo de células LLC-B sobre el dominio PEX de MMP-2 también promueve supervivencia, induciendo Mcl-1 de manera similar al PEX9. Estos datos sugieren que al menos el dominio PEX de MMP-9 (y pudiera ser que el de MMP-2 también) posee una región capaz de actuar como ligando de la integrina $\alpha 4\beta 1$ que promueve supervivencia en células LLC-B. Estos resultados representan la primera prueba de que una MMP puede tener una función completamente independiente de su actividad catalítica.

El efecto de supervivencia inducido por (pro)MMP-9 se produce a través de la activación de la Src quinasa Lyn, la posterior activación/fosforilación del factor STAT3, y la inducción de la proteína antiapoptótica Mcl-1. Lyn está constitutivamente activa en células LLC-B y parece jugar un papel importante en la resistencia a la apoptosis de estas células (Contri et al., 2005; Trentin et al., 2008). Se ha descrito que el tratamiento con inhibidores de Src quinasas como el dasatinib reduce la expresión de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-xL y la viabilidad de células LLC-B (Veldurthy et al., 2008). En este trabajo hemos demostrado que la señalización inducida por (pro)MMP-9 es sensible a dasatinib, aunque no a inhibidores del BCR-Abl, o de JAK2, lo que demuestra la independencia del sistema BCR y la especificidad de la vía de Lyn. Además Lyn se encuentra asociada a la integrina $\alpha 4\beta 1$, pero no a CD44v, que podría tener un efecto indirecto como correceptor de MMP-9, quizá estabilizando o favoreciendo la interacción entre la integrina $\alpha 4\beta 1$ y MMP-9. Por otra parte, silenciando la actividad de Lyn conseguimos prevenir tanto la activación de STAT3, como la inducción de Mcl-1, lo que demuestra que Lyn es fundamental para la supervivencia inducida por el anclaje de (pro)MMP-9 a la membrana celular.

Diversos estudios han establecido el papel de los factores STAT en la viabilidad celular (Karamouzis et al., 2007; Tsiftoglou et al., 2009). Actualmente se sabe que estos

factores se pueden activar por diversas rutas, incluyendo la de las quinasas Src, independiente de la ruta de JAK (Silva, 2004; Wang et al., 2007). Nosotros hemos identificado a STAT3 como el factor que se fosforila al cultivarse las células sobre (pro)MMP-9, y esta fosforilación depende de la activación de Lyn. STAT3 está también implicado en la supervivencia de células LLC-B a través de factores solubles como VEGF, y la inducción de diversas proteínas antiapoptóticas como Mcl-1 y XIAP (Lee et al., 2005). Actualmente se están realizando diversos estudios basados en la inhibición de STAT3, tratando de inducir apoptosis en células tumorales (Al Zaid Siddiquee and Turkson, 2008; Xin et al., 2009). En nuestro caso, hemos observado que el anclaje de (pro)MMP-9 a la membrana celular activa STAT3, y éste a su vez es capaz de viajar al núcleo e incrementar los niveles de transcripción de Mcl-1. No hemos observado incremento en otras proteínas antiapoptóticas como Bcl-xL, Bcl-2 o XIAP. Es posible que estas proteínas requieran una interacción de la integrina $\alpha 4 \beta 1$ con sus ligandos más prolongada. Podría ser interesante estudiar como el anclaje de MMP-9 a la membrana de células LLC-B regula la expresión de receptores o factores solubles que afecten la supervivencia, ciclo celular y angiogénesis de las células LLC-B.

Los niveles elevados de Mcl-1 en células LLC-B se han relacionado con factores de peor pronóstico y mayor resistencia a la apoptosis, y constituyen además una diferencia entre las células LLC-B residentes en ganglios respecto a las circulantes (Pepper et al., 2008). Mcl-1 es regulada positivamente por diversos estímulos como CD5, BCR, VEGF y el cultivo con células dendríticas foliculares o células estromales (Balakrishnan et al., 2009; Kitada et al., 1999; Lee et al., 2005; Longo et al., 2008; Petlickovski et al., 2005). Se están llevando a cabo muchos tratamientos con agentes quimioterapéuticos que disminuyen la expresión de Mcl-1 (Awan et al., 2009). En este trabajo hemos demostrado por primera vez que la activación de Lyn y STAT-3, debido a la unión de (pro)MMP-9 a $\alpha 4 \beta 1$, promueve un incremento en los niveles de Mcl-1, que permite secuestrar a la proteína proapoptótica Bim y prevenir el daño mitocondrial inducido en ausencia de MMP-9.

Además nuestros resultados demuestran que la resistencia a la apoptosis inducida por la integrina $\alpha 4 \beta 1$, se produce por diferentes mecanismos según el tipo de ligando que una. Así, la interacción VCAM-1/ $\alpha 4 \beta 1$ no activa Lyn ni incrementa los niveles de Mcl-1, sino que activa la ruta de PI3K/Akt, aumentando Bcl-xL, según se había descrito previamente en nuestro laboratorio (de la Fuente et al., 1999; de la Fuente et al., 2002).

De acuerdo con nuestros resultados, la adhesión de linfocitos T a VCAM-1 o a FN a través de la integrina $\alpha 4 \beta 1$ también induce una señalización diferente (Yakubenko et al., 2000). Como se indica en la **Figura 13**, hemos demostrado que VCAM-1 y MMP-9 promueven distintas señales de supervivencia, y el que se induzca una u otra podría depender de la localización o patrones de expresión de uno u otro ligando. Por tanto es importante analizar en profundidad la diferente señalización que puede estar ocurriendo en el interior celular dependiendo del ligando presente, o de la situación y el contexto en que se encuentre la célula, para poder establecer terapias adecuadas que permitan un mayor efecto antitumoral.

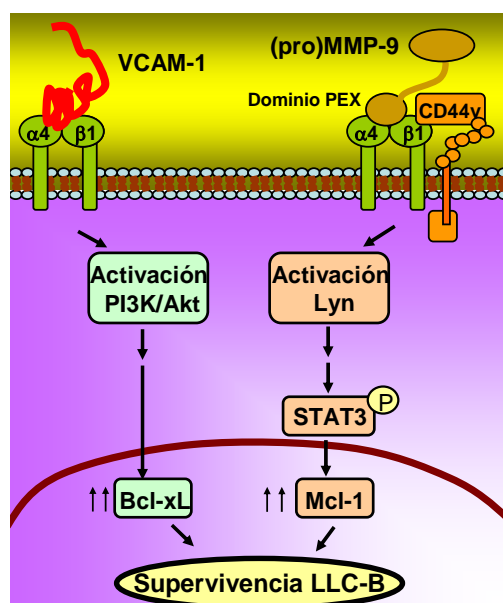


Figura 13. Señalización inducida por la interacción de la integrina $\alpha 4 \beta 1$ con sus ligandos VCAM-1 y MMP-9. La unión de la integrina $\alpha 4 \beta 1$ a sus ligandos promueve diferentes señales intracelulares que inducen supervivencia en células LLC-B.

Nuestros datos establecen un nuevo mecanismo de supervivencia utilizado por las células LLC-B. Este mecanismo se basa en el concepto de que MMP-9 utiliza la región PEX como ligando de la integrina $\alpha 4 \beta 1$. Este anclaje de (pro)MMP-9 a la integrina $\alpha 4 \beta 1$ induce además señales intracelulares independientes de la actividad catalítica de MMP-9. Aunque la proporción de MMP-9 basal adherida a la membrana celular es baja, y no parece suficiente para proteger de la apoptosis, durante la migración de células LLC-B a diferentes nichos metastáticos o ante incrementos en la concentración de MMP-9 en el medio, las células pueden unir una mayor cantidad de metaloproteínasa soluble (**Figura 14**). De este modo la MMP-9 unida a membrana podría regular la migración celular en estos ambientes metastáticos y enviar señales intracelulares que

favorezcan la supervivencia de células LLC-B. De acuerdo con esta hipótesis, al analizar las células de pacientes con LLC-B extraídas de sangre periférica o de nichos metastáticos como ganglios o médula ósea, hemos observado un incremento en la MMP-9 presente en la superficie celular en las células provenientes de los nichos con respecto a células LLC-B circulantes. De igual modo, los niveles constitutivos de Lyn y Mcl-1 también se encuentran aumentados en las células procedentes de órganos linfoides. Nuestros resultados muestran que cultivando las células LLC-B sobre células estromales se produce un incremento tanto en la presencia de MMP-9 en la superficie de células LLC-B, como en la supervivencia de las mismas. Esta MMP-9 puede ser producida tanto por las células LLC-B como por células locales. Estos resultados concuerdan con los observados previamente, referentes a la inducción de Mcl-1 en células LLC-B sobre estroma (Balakrishnan et al., 2009; Smit et al., 2007).

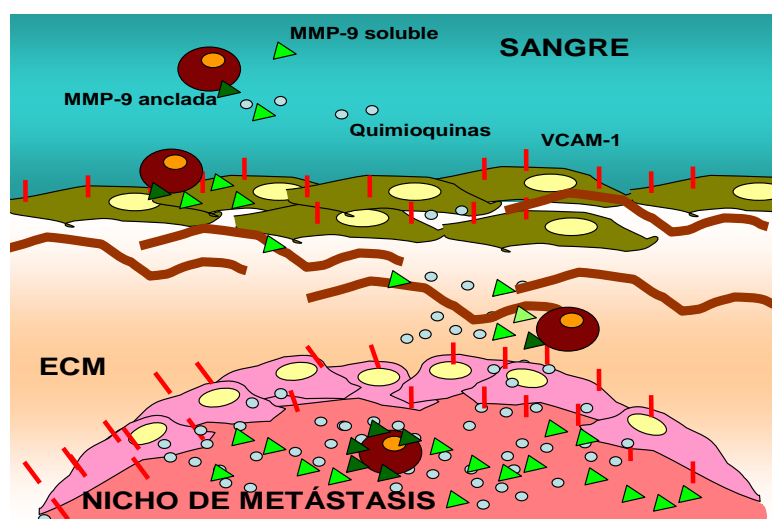


Figura 14. Influencia del ambiente extracelular en la inducción y localización de MMP-9 en las células LLC-B. Las células LLC-B son capaces de migrar durante la evolución de la enfermedad a nichos de metástasis o a microambientes que favorecen el anclaje de MMP-9 a la superficie celular, promoviendo supervivencia.

En un principio, con el descubrimiento de las MMPs y su importancia en la regulación tumoral, se las consideró unas posibles dianas terapéuticas en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, los ensayos clínicos con inhibidores frente a la actividad de las MMPs no han dado los resultados esperados (Overall and Kleinfeld, 2006). Actualmente aunque se tratan de desarrollar nuevos inhibidores más específicos, la idea de que las MMPs pueden tener un efecto dual durante la progresión tumoral empieza a imponerse sobre las teorías que únicamente las relacionaban con la progresión cancerosa (Lopez-Otin and Matrisian, 2007). Siempre se había partido de la base de una necesaria actividad enzimática de las MMPs para llevar a cabo sus diversas funciones. Sin embargo, recientes estudios han mostrado que la unión de TIMP-2 a MT-1 MMP es capaz de inducir señales intracelulares a través de la cola citoplasmática de la

proteasa sin necesidad de su actividad catalítica (D'Alessio et al., 2008). Los datos presentados en este trabajo muestran un nuevo papel para MMP-9 con importantes consecuencias para la patología de células LLC-B. Por una parte puede regular la migración celular, promoviéndola al encontrarse la proteasa en forma soluble o bloqueándola al anclarse a la membrana celular. Además MMP-9 puede generar señales, de forma catalítico-independiente, que induzcan supervivencia en células LLC-B, cuando se encuentren en un entorno adecuado. Estos resultados permiten abrir nuevas vías de investigación con el fin de estudiar la regulación, localización y funciones de MMP-9 en estas células tumorales. El estudio de las mismas puede ayudar a generar nuevas dianas terapéuticas para la enfermedad, así como nuevos agentes que bloqueen tanto la regulación como las diversas funciones (clásicas o nuevas como las aquí descritas) de MMP-9 y frenar así la progresión de la LLC-B.

Conclusiones

1º.- Las células LLC-B expresan fundamentalmente MMP-9. Además esta proteasa se expresa en unos niveles mucho mayores en estas células tumorales que en linfocitos B normales.

2º.- La adhesión de las células LLC-B a VCAM-1, FN, o células endoteliales mediada por la integrina $\alpha 4\beta 1$ incrementa los niveles de MMP-9 a través de la activación de la ruta PI3K/Akt/NF- κ B. La interacción de las quimioquinas CXCL12 y CCL21 con sus receptores CXCR4 y CCR7 aumenta los niveles de MMP-9 mediante la activación de la ruta de las MAPKs Erk1, 2/*c-fos*.

3º.- La actividad catalítica de MMP-9 es fundamental para la invasión y la migración transendotelial de las células LLC-B, y es detectable en los podosomas de estas células.

4º.- Una fracción de la MMP-9 producida se ancla a la membrana de las células LLC-B, pero no de otros tipos celulares B, a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$ y de una isoforma de CD44v de 190 kDa. Ambas moléculas constituyen un nuevo complejo de anclaje para MMP-9.

5º.- El anclaje de MMP-9 a la membrana de células LLC-B tiene dos consecuencias funcionales: bloquea la migración celular a través de Matrigel o endotelio mediante su actividad catalítica, y aumenta la viabilidad celular al actuar como ligando de la integrina $\alpha 4\beta 1$.

6.- La región hemopexina de MMP-9 es esencial para la unión de la proteasa a la integrina $\alpha 4\beta 1$. La adhesión celular a este dominio induce una señalización diferente a la activada por otros ligandos de la integrina como VCAM-1, y consiste en el aumento de expresión de Mcl-1 a través de la activación sucesiva de Lyn-SFK y el factor nuclear STAT3.

7.- Células LLC-B procedentes de órganos metastáticos como médula ósea y ganglios, o cultivadas sobre células estromales adquieren mayor expresión de MMP-9 en membrana, un incremento de Mcl-1 y de la activación de Lyn y una mayor resistencia a la apoptosis respecto a las células LLC-B circulantes.

Bibliografía

- Acuff, H. B., Carter, K. J., Fingleton, B., Gorden, D. L., and Matrisian, L. M. (2006). Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res* 66, 259-266.
- Al Zaid Siddiquee, K., and Turkson, J. (2008). STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res* 18, 254-267.
- Alfonso-Perez, M., Lopez-Giral, S., Quintana, N. E., Loscertales, J., Martin-Jimenez, P., and Munoz, C. (2006). Anti-CCR7 monoclonal antibodies as a novel tool for the treatment of chronic lymphocyte leukemia. *J Leuk Biol* 79, 1157-1165.
- Allen, S. J., Crown, S. E., and Handel, T. M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev of Immunol* 25, 787-820.
- Ara, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Egawa, T., Kawabata, K., and Nagasawa, T. (2003). Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity* 19, 257-267.
- Arechavaleta-Velasco, F., Ogando, D., Parry, S., and Vadillo-Ortega, F. (2002). Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-stimulated human amnion occurs through an autocrine and paracrine proinflammatory cytokine-dependent system. *Biol Repr* 67, 1952-1958.
- Arroyo, A. G., Yang, J. T., Rayburn, H., and Hynes, R. O. (1996). Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell* 85, 997-1008.
- Atkinson, J. J., and Senior, R. M. (2003). Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Resp Cell and Mol Biol* 28, 12-24.
- Awan, F. T., Kay, N. E., Davis, M. E., Wu, W., Geyer, S. M., Leung, N., Jelinek, D. F., Tschumper, R. C., Secreto, C. R., Lin, T. S., *et al.* (2009). Mcl-1 expression predicts progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia patients treated with pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab. *Blood* 113, 535-537.
- Baker, A. H., Edwards, D. R., and Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 115, 3719-3727.
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K. Y., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelier, F. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280, 35760-35766.
- Balakrishnan, K., Burger, J. A., Wierda, W. G., and Gandhi, V. (2009). AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood* 113, 149-153.
- Baldini, L. G., and Cro, L. M. (1994). Structure and function of VLA integrins: differential expression in B-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 12, 197-203.
- Barragan, M., Campas, C., Bellosillo, B., and Gil, J. (2003). Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 44, 1865-1870.
- Bassi, D. E., Lopez De Cicco, R., Mahloogi, H., Zucker, S., Thomas, G., and Klein-Szanto, A. J. (2001). Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10326-10331.
- Bauvois, B., Dumont, J., Mathiot, C., and Kolb, J. P. (2002). Production of matrix metalloproteinase-9 in early stage B-CLL: suppression by interferons. *Leukemia* 16, 791-798.
- Bednarczyk, J. L., and McIntyre, B. W. (1992). Expression and ligand-binding function of the integrin alpha 4 beta 1 (VLA-4) on neural-crest-derived tumor cell lines. *Clin Exp Metastasis* 10, 281-290.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., and Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2, 737-744.
- Bergui, L., Tesio, L., Schena, M., Riva, M., Malavasi, F., Schulz, T., Marchisio, P. C., and Caligaris-Cappio, F. (1988). CD5 and CD21 molecules are a functional unit in the cell/substrate adhesion of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Eur J Immunol* 18, 89-96.
- Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguier, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., *et al.* (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48, 198-206.

- Bjorklund, M., Aitio, O., Stefanidakis, M., Suojanen, J., Salo, T., Sorsa, T., and Koivunen, E. (2006). Stabilization of the activated alphaMbeta2 integrin by a small molecule inhibits leukocyte migration and recruitment. *Biochemistry* 45, 2862-2871.
- Bjorklund, M., and Koivunen, E. (2005). Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochem Biophys Acta* 1755, 37-69.
- Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T. A. (1996a). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-833.
- Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A., and Springer, T. A. (1996b). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184, 1101-1109.
- Bode, W., Grams, F., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F. X., Baumann, U., McKay, D. B., and Stocker, W. (1996). The metzincin-superfamily of zinc-peptidases. *Adv Exp Med Biol* 389, 1-11.
- Bourguignon, L. Y., Gunja-Smith, Z., Iida, N., Zhu, H. B., Young, L. J., Muller, W. J., and Cardiff, R. D. (1998). CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J Cell Physiol* 176, 206-215.
- Brand, S., Dambacher, J., Beigel, F., Olszak, T., Diebold, J., Otte, J. M., Goke, B., and Eichhorst, S. T. (2005). CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res* 310, 117-130.
- Brew, K., Dinakarpanian, D., and Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem Biophys Acta* 1477, 267-283.
- Brooks, P. C., Silletti, S., von Schalscha, T. L., Friedlander, M., and Cheresch, D. A. (1998). Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 92, 391-400.
- Burger, J. A., Burger, M., and Kipps, T. J. (1999). Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 94, 3658-3667.
- Burger, M., Hartmann, T., Krome, M., Rawluk, J., Tamamura, H., Fujii, N., Kipps, T. J., and Burger, J. A. (2005). Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 106, 1824-1830.
- Burkle, A., Niedermeier, M., Schmitt-Graff, A., Wierda, W. G., Keating, M. J., and Burger, J. A. (2007). Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 110, 3316-3325.
- Caligaris-Cappio, F. (1997). Relationship between autoimmunity and immunodeficiency in CLL. *Hematology and Cell Therapy* 39 Suppl 1, S13-16.
- Caligaris-Cappio, F., Bergui, L., Tesio, L., Corbascio, G., Tousco, F., and Marchisio, P. C. (1986). Cytoskeleton organization is aberrantly rearranged in the cells of B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Blood* 67, 233-239.
- Caligaris-Cappio, F., and Ghia, P. (2008). Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol* 26, 4497-4503.
- Caligaris-Cappio, F., Gottardi, D., Alfarano, A., Stacchini, A., Gregoretti, M. G., Ghia, P., Bertero, M. T., Novarino, A., and Bergui, L. (1993). The nature of the B lymphocyte in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells* 19, 601-613.
- Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A., and Butcher, E. C. (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279, 381-384.
- Castro, A., Bono, M. R., Simon, V., Vargas, L., and Roseblatt, M. (1997). Spleen-derived stromal cells. Adhesion molecules expression and lymphocyte adhesion to reticular cells. *Eur J Cell Biol* 74, 321-328.
- Caudroy, S., Polette, M., Nawrocki-Raby, B., Cao, J., Toole, B. P., Zucker, S., and Birembaut, P. (2002). EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis* 19, 697-702.

- Cauwe, B., Martens, E., Van den Steen, P. E., Proost, P., Van Aelst, I., Blockmans, D., and Opdenakker, G. (2008). Adenylyl cyclase-associated protein-1/CAP1 as a biological target substrate of gelatinase B/MMP-9. *Exp Cell Res* 314, 2739-2749.
- Cauwe, B., Van den Steen, P. E., and Opdenakker, G. (2007). The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42, 113-185.
- Cichy, J., and Pure, E. (2003). The liberation of CD44. *J Cell Biol* 161, 839-843.
- Contri, A., Brunati, A. M., Trentin, L., Cabrelle, A., Miorin, M., Cesaro, L., Pinna, L. A., Zambello, R., Semenzato, G., and Donella-Deana, A. (2005). Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest* 115, 369-378.
- Chan, J. R., Hyduk, S. J., and Cybulsky, M. I. (2003). Detecting rapid and transient upregulation of leukocyte integrin affinity induced by chemokines and chemoattractants. *J Immunol Methods* 273, 43-52.
- Chen, E. I., Li, W., Godzik, A., Howard, E. W., and Smith, J. W. (2003). A residue in the S2 subsite controls substrate selectivity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 278, 17158-17163.
- Chen, H., Treweek, A. T., West, D. C., Till, K. J., Cawley, J. C., Zuzel, M., and Toh, C. H. (2000). In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 96, 3181-3187.
- Chiorazzi, N., Allen, S. L., and Ferrarini, M. (2005a). Clinical and laboratory parameters that define clinically relevant B-CLL subgroups. *Curr Topics Microbiol Immunol* 294, 109-133.
- Chiorazzi, N., Rai, K. R., and Ferrarini, M. (2005b). Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 352, 804-815.
- D'Alessio, S., Ferrari, G., Cinnante, K., Scheerer, W., Galloway, A. C., Roses, D. F., Rozanov, D. V., Remacle, A. G., Oh, E. S., Shiryaev, S. A., *et al.* (2008). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 binding to membrane-type 1 matrix metalloproteinase induces MAPK activation and cell growth by a non-proteolytic mechanism. *J Biol Chem* 283, 87-99.
- D'Apuzzo, M., Rolink, A., Loetscher, M., Hoxie, J. A., Clark-Lewis, I., Melchers, F., Baggiolini, M., and Moser, B. (1997). The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *Eur J Immunol* 27, 1788-1793.
- de la Fuente, M. T., Casanova, B., Garcia-Gila, M., Silva, A., and Garcia-Pardo, A. (1999). Fibronectin interaction with alpha4beta1 integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia* 13, 266-274.
- de la Fuente, M. T., Casanova, B., Moyano, J. V., Garcia-Gila, M., Sanz, L., Garcia-Marco, J., Silva, A., and Garcia-Pardo, A. (2002). Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J Leuk Biol* 71, 495-502.
- De Rossi, G., Marroni, P., Paganuzzi, M., Mauro, F. R., Tenca, C., Zarcone, D., Velardi, A., Molica, S., and Grossi, C. E. (1997). Increased serum levels of soluble CD44 standard, but not of variant isoforms v5 and v6, in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 11, 134-141.
- De Rossi, G., Zarcone, D., Mauro, F., Cerruti, G., Tenca, C., Puccetti, A., Mandelli, F., and Grossi, C. E. (1993). Adhesion molecule expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: malignant cell phenotypes define distinct disease subsets. *Blood* 81, 2679-2687.
- Delany, A. M., Jeffrey, J. J., Rydzziel, S., and Canalis, E. (1995). Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 270, 26607-26612.
- Deryugina, E. I., and Quigley, J. P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25, 9-34.
- Deryugina, E. I., Zijlstra, A., Partridge, J. J., Kupriyanova, T. A., Madsen, M. A., Papagiannakopoulos, T., and Quigley, J. P. (2005). Unexpected effect of matrix metalloproteinase down-regulation on vascular intravasation and metastasis of human fibrosarcoma cells selected in vivo for high rates of dissemination. *Cancer Res* 65, 10959-10969.
- Edelmann, J., Klein-Hitpass, L., Carpinteiro, A., Fuhrer, A., Sellmann, L., Stilgenbauer, S., Duhrsen, U., and Durig, J. (2008). Bone marrow fibroblasts induce expression of PI3K/NF-kappaB pathway genes and a pro-angiogenic phenotype in CLL cells. *Leukemia Res* 32, 1565-1572.

- Egawa, T., Kawabata, K., Kawamoto, H., Amada, K., Okamoto, R., Fujii, N., Kishimoto, T., Katsura, Y., and Nagasawa, T. (2001). The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity* 15, 323-334.
- Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev* 2, 161-174.
- Eisterer, W., Bechter, O., Soderberg, O., Nilsson, K., Terol, M., Greil, R., Thaler, J., Herold, M., Finke, L., Gunthert, U., *et al.* (2004). Elevated levels of soluble CD44 are associated with advanced disease and in vitro proliferation of neoplastic lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia Res* 28, 1043-1051.
- Escobar-Diaz, E., Lopez-Martin, E. M., Hernandez del Cerro, M., Puig-Kroger, A., Soto-Cerrato, V., Montaner, B., Giral, E., Garcia-Marco, J. A., Perez-Tomas, R., and Garcia-Pardo, A. (2005). AT514, a cyclic depsipeptide from *Serratia marcescens*, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells: interference with the Akt/NF-kappaB survival pathway. *Leukemia* 19, 572-579.
- Esparza, J., Vilardell, C., Calvo, J., Juan, M., Vives, J., Urbano-Marquez, A., Yague, J., and Cid, M. C. (1999). Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator MT1-MMP (MMP-14) by human T lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathways. *Blood* 94, 2754-2766.
- Fisher, J. F., and Mobashery, S. (2006). Recent advances in MMP inhibitor design. *Cancer Metastasis Rev* 25, 115-136.
- Galvez, B. G., Matias-Roman, S., Albar, J. P., Sanchez-Madrid, F., and Arroyo, A. G. (2001). Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *J Biol Chem* 276, 37491-37500.
- Ganju, R. K., Brubaker, S. A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W., and Groopman, J. E. (1998). The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 273, 23169-23175.
- Garcia-Pardo, A., Wayner, E. A., Carter, W. G., and Ferreira, O. C., Jr. (1990a) Human B lymphocytes define an alternative mechanism of adhesion to fibronectin. The interaction of the alpha 4 beta 1 integrin with the LHGPEILDVPST sequence of the type III connecting segment is sufficient to promote cell attachment. *J Immunol* 144, 3361-3366.
- Garcia-Pardo, A., and Ferreira, O. C. (1990b). Adhesion of human T-lymphoid cells to fibronectin is mediated by two different fibronectin domains. *Immunology* 69, 121-126.
- Gattei, V., Bulian, P., Del Principe, M. I., Zucchetto, A., Maurillo, L., Buccisano, F., Bomben, R., Dal-Bo, M., Luciano, F., Rossi, F. M., *et al.* (2008). Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111, 865-873.
- Geurts, N., Martens, E., Van Aelst, I., Proost, P., Opdenakker, G., and Van den Steen, P. E. (2008). Beta-hematin interaction with the hemopexin domain of gelatinase B/MMP-9 provokes autocatalytic processing of the propeptide, thereby priming activation by MMP-3. *Biochemistry* 47, 2689-2699.
- Ghia, P., and Caligaris-Cappio, F. (2000). The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res* 79, 157-173.
- Ghobrial, I. M., Bone, N. D., Stenson, M. J., Novak, A., Hedin, K. E., Kay, N. E., and Ansell, S. M. (2004). Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma. *Mayo Clinic Proc* 79, 318-325.
- Gitmon, M., and Buccione, R. (2006). Adhesions that mediate invasion. *Internatl J Biochem Cell Biol* 38, 1875-1892.
- Gora-Tybor, J., Blonski, J. Z., and Robak, T. (2005). Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur Cytokine Network* 16, 41-46.
- Gottardi, D., Alfarano, A., De Leo, A. M., Stacchini, A., Bergui, L., and Caligaris-Cappio, F. (1995). Defective apoptosis due to Bcl-2 overexpression may explain why B-CLL cells accumulate in G0. *Curr Topics Microbiol Immunol* 194, 307-312.

- Grabovsky, V., Feigelson, S., Chen, C., Bleijis, D. A., Peled, A., Cinamon, G., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., Lapidot, T., van Kooyk, Y., *et al.* (2000). Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med* 192, 495-506.
- Granziero, L., Ghia, P., Circosta, P., Gottardi, D., Strola, G., Geuna, M., Montagna, L., Piccoli, P., Chilosi, M., and Caligaris-Cappio, F. (2001). Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 97, 2777-2783.
- Grayson, M. H., Van der Vieren, M., Sterbinsky, S. A., Michael Gallatin, W., Hoffman, P. A., Staunton, D. E., and Bochner, B. S. (1998). alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J Exp Med* 188, 2187-2191.
- Gross, J., and Lapiere, C. M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 48, 1014-1022.
- Hartmann, T. N., Grabovsky, V., Wang, W., Desch, P., Rubenzer, G., Wollner, S., Binsky, I., Vallon-Eberhard, A., Sapoznikov, A., Burger, M., *et al.* (2009). Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer Res* 69, 3121-3130.
- Hidalgo, M., and Eckhardt, S. G. (2001). Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Institute* 93, 178-193.
- Hu, C., Xiong, J., Zhang, L., Huang, B., Zhang, Q., Li, Q., Yang, M., Wu, Y., Wu, Q., Shen, Q., *et al.* (2004a). PEG10 activation by co-stimulation of CXCR5 and CCR7 essentially contributes to resistance to apoptosis in CD19+CD34+ B cells from patients with B cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia. *Cell Mol Immunol* 1, 280-294.
- Hu, J., Van den Steen, P. E., Dillen, C., and Opdenakker, G. (2005). Targeting neutrophil collagenase/matrix metalloproteinase-8 and gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 with a peptidomimetic inhibitor protects against endotoxin shock. *Biochem Pharma* 70, 535-544.
- Hu, J., Van den Steen, P. E., Houde, M., Ilenchuk, T. T., and Opdenakker, G. (2004b). Inhibitors of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 activity comparison of a peptidomimetic and polyhistidine with single-chain derivatives of a neutralizing monoclonal antibody. *Biochem Pharma* 67, 1001-1009.
- Hughes, P. E., and Pfaff, M. (1998). Integrin affinity modulation. *Trends in Cell Biology* 8, 359-364.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Imai, K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M. D., and Okada, Y. (1997). Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J* 322, 809-814.
- Ip, Y. C., Cheung, S. T., and Fan, S. T. (2007). Atypical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase in the nucleus is associated with aggressive features of hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinogenesis* 46, 225-230.
- Itoh, Y., and Seiki, M. (2004). MT1-MMP: an enzyme with multidimensional regulation. *Trends Biochem Sci* 29, 285-289.
- Jacobsen, K., Kravitz, J., Kincade, P. W., and Osmond, D. G. (1996). Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood* 87, 73-82.
- Jewell, A. P., and Yong, K. L. (1997). Regulation and function of adhesion molecules in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Acta Haematologica* 97, 67-72.
- Jiang, Y., Goldberg, I. D., and Shi, Y. E. (2002). Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 21, 2245-2252.
- Kamiguti, A. S., Lee, E. S., Till, K. J., Harris, R. J., Glenn, M. A., Lin, K., Chen, H. J., Zuzel, M., and Cawley, J. C. (2004). The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 125, 128-140.

- Kara, I. O., Sahin, B., and Gunesacar, R. (2007). Expression of soluble CD27 and interleukins-8 and -10 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease stage and prognosis. *Adv Ther* 24, 29-40.
- Karamouzis, M. V., Konstantinopoulos, P. A., and Papavassiliou, A. G. (2007). The role of STATs in lung carcinogenesis: an emerging target for novel therapeutics. *J Mol Med* 85, 427-436.
- Kay, N. E. (2004). The angiogenic status of B-CLL B cells: role of the VEGF receptors. *Leukemia Res* 28, 221-222.
- Kay, N. E., Hamblin, T. J., Jelinek, D. F., Dewald, G. W., Byrd, J. C., Farag, S., Lucas, M., and Lin, T. (2002). Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 193-213.
- Kinashi, T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev* 5, 546-559.
- Kitada, S., Zapata, J. M., Andreeff, M., and Reed, J. C. (1999). Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 106, 995-1004.
- Kunigal, S., Lakka, S. S., Joseph, P., Estes, N., and Rao, J. S. (2008). Matrix metalloproteinase-9 inhibition down-regulates radiation-induced nuclear factor-kappa B activity leading to apoptosis in breast tumors. *Clin Cancer Res* 14, 3617-3626.
- Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C., and Stryckmans, P. (1998). Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 91, 2387-2396.
- Lagneaux, L., Delforge, A., De Bruyn, C., Bernier, M., and Bron, D. (1999). Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia & Lymphoma* 35, 445-453.
- Leber, T. M., and Balkwill, F. R. (1998). Regulation of monocyte MMP-9 production by TNF-alpha and a tumour-derived soluble factor (MMP-SF). *Br J Cancer* 78, 724-732.
- Lee, J. L., Wang, M. J., and Chen, J. Y. (2009). Acetylation and activation of STAT3 mediated by nuclear translocation of CD44. *J Cell Biol* 185, 949-957.
- Lee, Y. K., Shanafelt, T. D., Bone, N. D., Strege, A. K., Jelinek, D. F., and Kay, N. E. (2005). VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: implication for apoptosis resistance. *Leukemia* 19, 513-523.
- Lepage, T., and Gache, C. (1990). Early expression of a collagenase-like hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *EMBO J* 9, 3003-3012.
- Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol* 17, 107-117.
- Linder, S., and Aepfelbacher, M. (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol* 13, 376-385.
- Linnet, M. S., Schubauer-Berigan, M. K., Weisenburger, D. D., Richardson, D. B., Landgren, O., Blair, A., Silver, S., Field, R. W., Caldwell, G., Hatch, M., and Dores, G. M. (2007). Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *Br J Haematol* 139, 672-686.
- Lobb, R. R., and Hemler, M. E. (1994). The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J Clin Invest* 94, 1722-1728.
- Longo, P. G., Laurenti, L., Gobessi, S., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D. G. (2008). The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 111, 846-855.
- Lopez-Giral, S., Quintana, N. E., Cabrerizo, M., Alfonso-Perez, M., Sala-Valdes, M., De Soria, V. G., Fernandez-Ranada, J. M., Fernandez-Ruiz, E., and Munoz, C. (2004). Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J Leuk Biol* 76, 462-471.
- Lopez-Otin, C., and Matrisian, L. M. (2007). Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev* 7, 800-808.

- Luca, M., Huang, S., Gershenwald, J. E., Singh, R. K., Reich, R., and Bar-Eli, M. (1997). Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 151, 1105-1113.
- Luster, A. D., Alon, R., and von Andrian, U. H. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6, 1182-1190.
- Llano, E., Pendas, A. M., Aza-Blanc, P., Kornberg, T. B., and Lopez-Otin, C. (2000). Dm1-MMP, a matrix metalloproteinase from *Drosophila* with a potential role in extracellular matrix remodeling during neural development. *J Biol Chem* 275, 35978-35985.
- Majolini, M. B., D'Elios, M. M., Galieni, P., Boncristiano, M., Lauria, F., Del Prete, G., Telford, J. L., and Baldari, C. T. (1998). Expression of the T-cell-specific tyrosine kinase Lck in normal B-1 cells and in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 91, 3390-3396.
- Marchisio, P. C., Bergui, L., Corbascio, G. C., Cremona, O., D'Urso, N., Schena, M., Tesio, L., and Caligaris-Cappio, F. (1988). Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood* 72, 830-833.
- Marhaba, R., and Zoller, M. (2004). CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol* 35, 211-231.
- Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22, 368-376.
- Martens, E., Leyssen, A., Van Aelst, I., Fiten, P., Piccard, H., Hu, J., Descamps, F. J., Van den Steen, P. E., Proost, P., Van Damme, J., *et al.* (2007). A monoclonal antibody inhibits gelatinase B/MMP-9 by selective binding to part of the catalytic domain and not to the fibronectin or zinc binding domains. *Biochem Biophys Acta* 1770, 178-186.
- Mattu, T. S., Royle, L., Langridge, J., Wormald, M. R., Van den Steen, P. E., Van Damme, J., Opdenakker, G., Harvey, D. J., Dwek, R. A., and Rudd, P. M. (2000). O-glycan analysis of natural human neutrophil gelatinase B using a combination of normal phase-HPLC and online tandem mass spectrometry: implications for the domain organization of the enzyme. *Biochemistry* 39, 15695-15704.
- McGeehan, G., Burkhart, W., Anderegg, R., Becherer, J. D., Gillikin, J. W., and Graham, J. S. (1992). Sequencing and Characterization of the Soybean Leaf Metalloproteinase: Structural and Functional Similarity to the Matrix Metalloproteinase Family. *Plant Physiol* 99, 1179-1183.
- McQuibban, G. A., Butler, G. S., Gong, J. H., Bendall, L., Power, C., Clark-Lewis, I., and Overall, C. M. (2001). Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem* 276, 43503-43508.
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Manes, S., and Martinez, A. C. (2001). Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev of Immunol* 19, 397-421.
- Michie, A. M., Nakagawa, R., and McCaig, A. M. (2007). Murine models for chronic lymphocytic leukaemia. *Biochemical Society Transactions* 35, 1009-1012.
- Miki, T., Takegami, Y., Okawa, K., Muraguchi, T., Noda, M., and Takahashi, C. (2007). The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. *J Biol Chem* 282, 12341-12352.
- Mira, E., Lacalle, R. A., Buesa, J. M., de Buitrago, G. G., Jimenez-Baranda, S., Gomez-Mouton, C., Martinez, A. C., and Manes, S. (2004). Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface. *J Cell Sci* 117, 1847-1857.
- Mitsiades, N., Yu, W. H., Poulaki, V., Tsokos, M., and Stamenkovic, I. (2001). Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res* 61, 577-581.
- Mohle, R., Failenschmid, C., Bautz, F., and Kanz, L. (1999). Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia* 13, 1954-1959.
- Molica, S. (2001). Angiogenesis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: methods of study, clinical significance and prognostic implications. *Leukemia & Lymphoma* 42, 603-607.

- Molica, S., Vitelli, G., Levato, D., Giannarelli, D., Vacca, A., Cuneo, A., Cavazzini, F., Squillace, R., Mirabelli, R., and Digiesi, G. (2003). Increased serum levels of matrix metalloproteinase-9 predict clinical outcome of patients with early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol* 70, 373-378.
- Monaco, S., Sparano, V., Gioia, M., Sbardella, D., Di Pierro, D., Marini, S., and Coletta, M. (2006). Enzymatic processing of collagen IV by MMP-2 (gelatinase A) affects neutrophil migration and it is modulated by extracatalytic domains. *Protein Sci* 15, 2805-2815.
- Monferran, S., Paupert, J., Dauvillier, S., Salles, B., and Muller, C. (2004). The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9. *EMBO J* 23, 3758-3768.
- Mook, O. R., Frederiks, W. M., and Van Noorden, C. J. (2004). The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochem Biophys Acta* 1705, 69-89.
- Moser, B., Wolf, M., Walz, A., and Loetscher, P. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25, 75-84.
- Moyano, J. V., Carnemolla, B., Albar, J. P., Leprini, A., Gaggero, B., Zardi, L., and Garcia-Pardo, A. (1999). Cooperative role for activated alpha4 beta1 integrin and chondroitin sulfate proteoglycans in cell adhesion to the heparin III domain of fibronectin. Identification of a novel heparin and cell binding sequence in repeat III5. *J Biol Chem* 274, 135-142.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.
- Nabha, S. M., Bonfil, R. D., Yamamoto, H. A., Belizi, A., Wiesner, C., Dong, Z., and Cher, M. L. (2006). Host matrix metalloproteinase-9 contributes to tumor vascularization without affecting tumor growth in a model of prostate cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 23, 335-344.
- Nagase, H., and Woessner, J. F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-21494.
- Nagira, M., Imai, T., Yoshida, R., Takagi, S., Iwasaki, M., Baba, M., Tabira, Y., Akagi, J., Nomiyama, H., and Yoshie, O. (1998). A lymphocyte-specific CC chemokine, secondary lymphoid tissue chemokine (SLC), is a highly efficient chemoattractant for B cells and activated T cells. *Eur J Immunol* 28, 1516-1523.
- Nakagawa, R., Soh, J. W., and Michie, A. M. (2006). Subversion of protein kinase C alpha signaling in hematopoietic progenitor cells results in the generation of a B-cell chronic lymphocytic leukemia-like population in vivo. *Cancer Res* 66, 527-534.
- Nakahara, H., Howard, L., Thompson, E. W., Sato, H., Seiki, M., Yeh, Y., and Chen, W. T. (1997). Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 7959-7964.
- Naor, D., Sionov, R. V., and Ish-Shalom, D. (1997). CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 71, 241-319.
- Neish, A. S., Williams, A. J., Palmer, H. J., Whitley, M. Z., and Collins, T. (1992). Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med* 176, 1583-1593.
- Nguyen, J., Knapnougel, P., Lesavre, P., and Bauvois, B. (2005). Inhibition of matrix metalloproteinase-9 by interferons and TGF-beta1 through distinct signalings accounts for reduced monocyte invasiveness. *FEBS Lett* 579, 5487-5493.
- Nuckel, H., Switala, M., Collins, C. H., Sellmann, L., Grosse-Wilde, H., Duhrsen, U., and Rebmann, V. (2009). High CD49d protein and mRNA expression predicts poor outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Immunol* 131, 472-80.
- Nyormoi, O., Mills, L., and Bar-Eli, M. (2003). An MMP-2/MMP-9 inhibitor, 5a, enhances apoptosis induced by ligands of the TNF receptor superfamily in cancer cells. *Cell Death and Differentiation* 10, 558-569.
- Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J. M., Clark-Lewis, I., Legler, D. F., *et al.* (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382, 833-835.
- Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R. M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D. B., *et al.* (2001). The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 107, 789-800.

- Okamoto, H., Nishimura, H., Shinozaki, A., Zhang, D., Hirose, S., and Shirai, T. (1993). H-2z homozygous New Zealand mice as a model for B-cell chronic lymphocytic leukemia: elevated bcl-2 expression in CD5 B cells at premalignant and malignant stages. *Jpn J Cancer Res* 84, 1273-1278.
- Opdenakker, G., Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Van Coillie, E., Masure, S., Proost, P., and Van Damme, J. (2001). Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leuk Biol* 69, 851-859.
- Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., and Lobb, R. (1989). Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59, 1203-1211.
- Overall, C. M. (2001). Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods Mol Biol* 151, 79-120.
- Overall, C. M., and Kleifeld, O. (2006). Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev* 6, 227-239.
- Overall, C. M., and Lopez-Otin, C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev* 2, 657-672.
- Overall, C. M., Wrana, J. L., and Sodek, J. (1991). Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* 266, 14064-14071.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev* 8, 221-233.
- Paquette, B., Bisson, M., Therriault, H., Lemay, R., Pare, M., Banville, P., and Cantin, A. M. (2003). Activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 by 2- and 4-hydroxyestradiol. *J Steroid Biochem Mol Biol* 87, 65-73.
- Parmo-Cabanas, M., Molina-Ortiz, I., Matias-Roman, S., Garcia-Bernal, D., Carvajal-Vergara, X., Valle, I., Pandiella, A., Arroyo, A. G., and Teixido, J. (2006). Role of metalloproteinases MMP-9 and MT1-MMP in CXCL12-promoted myeloma cell invasion across basement membranes. *J Pathol* 208, 108-118.
- Partridge, J. J., Madsen, M. A., Ardi, V. C., Papagiannakopoulos, T., Kupriyanova, T. A., Quigley, J. P., and Deryugina, E. I. (2007). Functional analysis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases differentially expressed by variants of human HT-1080 fibrosarcoma exhibiting high and low levels of intravasation and metastasis. *J Biol Chem* 282, 35964-35977.
- Peled, A., Grabovsky, V., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Petit, I., Ben-Hur, H., Lapidot, T., and Alon, R. (1999). The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest* 104, 1199-1211.
- Pepper, C., Lin, T. T., Pratt, G., Hewamana, S., Brennan, P., Hiller, L., Hills, R., Ward, R., Starczynski, J., Austen, B., *et al.* (2008). Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* 112, 3807-3817.
- Peppin, G. J., and Weiss, S. J. (1986). Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4322-4326.
- Petlickovski, A., Laurenti, L., Li, X., Marietti, S., Chiusolo, P., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D. G. (2005). Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 105, 4820-4827.
- Piccard, H., Van den Steen, P. E., and Opdenakker, G. (2007). Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. *J Leuk Biol* 81, 870-892.
- Pierce, K. L., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev* 3, 639-650.
- Pittner, B. T., Shanafelt, T. D., Kay, N. E., and Jelinek, D. F. (2005). CD38 expression levels in chronic lymphocytic leukemia B cells are associated with activation marker expression and differential responses to interferon stimulation. *Leukemia* 19, 2264-2272.
- Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P. A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev* 4, 33-45.

- Pribila, J. T., Quale, A. C., Mueller, K. L., and Shimizu, Y. (2004). Integrins and T cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 22, 157-180.
- Proudfoot, A. E. (2002). Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev* 2, 106-115.
- Proudfoot, A. E., Handel, T. M., Johnson, Z., Lau, E. K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T. N., and Kosco-Vilbois, M. H. (2003). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 1885-1890.
- Quiney, C., Billard, C., Mirshahi, P., Fourneron, J. D., and Kolb, J. P. (2006). Hyperforin inhibits MMP-9 secretion by B-CLL cells and microtubule formation by endothelial cells. *Leukemia* 20, 583-589.
- Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., and Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46, 219-234.
- Richardson, S. J., Matthews, C., Catherwood, M. A., Alexander, H. D., Carey, B. S., Farrugia, J., Gardiner, A., Mould, S., Oscier, D., Copplestone, J. A., and Prentice, A. G. (2006). ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 107, 3584-3592.
- Ringshausen, I., Dechow, T., Schneller, F., Weick, K., Oelsner, M., Peschel, C., and Decker, T. (2004). Constitutive activation of the MAPkinase p38 is critical for MMP-9 production and survival of B-CLL cells on bone marrow stromal cells. *Leukemia* 18, 1964-1970.
- Rosati, E., Sabatini, R., Rampino, G., Tabilio, A., Di Ianni, M., Fettucciari, K., Bartoli, A., Coaccioli, S., Screpanti, I., and Marconi, P. (2009). Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* 113, 856-865.
- Rose, D. M., Han, J., and Ginsberg, M. H. (2002). Alpha4 integrins and the immune response. *Immunol Rev* 186, 118-124.
- Rosenblum, G., Van den Steen, P. E., Cohen, S. R., Grossmann, J. G., Frenkel, J., Sertchook, R., Slack, N., Strange, R. W., Opdenakker, G., and Sagi, I. (2007). Insights into the structure and domain flexibility of full-length pro-matrix metalloproteinase-9/gelatinase B. *Structure* 15, 1227-1236.
- Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.
- Salomon, D. R., Crisa, L., Mojcik, C. F., Ishii, J. K., Klier, G., and Shevach, E. M. (1997). Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood* 89, 2461-2471.
- Salomon, D. R., Mojcik, C. F., Chang, A. C., Wadsworth, S., Adams, D. H., Coligan, J. E., and Shevach, E. M. (1994). Constitutive activation of integrin alpha 4 beta 1 defines a unique stage of human thymocyte development. *J Exp Med* 179, 1573-1584.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Mackay, C. R. (1998). Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19, 568-574.
- Sanceau, J., Truchet, S., and Bauvois, B. (2003). Matrix metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells. *J Biol Chem* 278, 36537-36546.
- Sanchez-Aparicio, P., Dominguez-Jimenez, C., and Garcia-Pardo, A. (1994). Activation of the alpha 4 beta 1 integrin through the beta 1 subunit induces recognition of the RGDS sequence in fibronectin. *J Cell Biol* 126, 271-279.
- Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K., and Seiki, M. (1996). Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett* 393, 101-104.
- Schena, M., Gaidano, G., Gottardi, D., Malavasi, F., Larsson, L. G., Nilsson, K., and Caligaris-Cappio, F. (1992). Molecular investigation of the cytokines produced by normal and malignant B lymphocytes. *Leukemia* 6, 120-125.
- Schweickart, V. L., Raport, C. J., Godiska, R., Byers, M. G., Eddy, R. L., Jr., Shows, T. B., and Gray, P. W. (1994). Cloning of human and mouse EB11, a lymphoid-specific G-protein-coupled receptor encoded on human chromosome 17q12-q21.2. *Genomics* 23, 643-650.
- Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., and Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495-500.

- Silva, C. M. (2004). Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 23, 8017-8023.
- Sironi, M., Sclaccia, F. L., Matteucci, C., Conni, M., Vecchi, A., Bernasconi, S., Minty, A., Caput, D., Ferrara, P., Colotta, F., and et al. (1994). Regulation of endothelial and mesothelial cell function by interleukin-13: selective induction of vascular cell adhesion molecule-1 and amplification of interleukin-6 production. *Blood* 84, 1913-1921.
- Smit, L. A., Hallaert, D. Y., Spijker, R., de Goeij, B., Jaspers, A., Kater, A. P., van Oers, M. H., van Noesel, C. J., and Eldering, E. (2007). Differential Noxa/Mcl-1 balance in peripheral versus lymph node chronic lymphocytic leukemia cells correlates with survival capacity. *Blood* 109, 1660-1668.
- Smolej, L., Andrys, C., Maisnar, V., Pour, L., and Maly, J. (2005). Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in lymphoproliferative disorders. *Acta Medica* 48, 57-58.
- Sneddon, J. B., and Werb, Z. (2007). Location, location, location: the cancer stem cell niche. *Cell Stem Cell* 1, 607-611.
- Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200, 448-464.
- Stefanidakis, M., Ruotula, T., Borregaard, N., Gahmberg, C. G., and Koivunen, E. (2004). Intracellular and cell surface localization of a complex between alphaMbeta2 integrin and promatrix metalloproteinase-9 progelatinase in neutrophils. *J Immunol* 172, 7060-7068.
- Sternlicht, M. D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516.
- Stetler-Stevenson, W. G. (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 8;1(27): re6.
- Stocker, W., and Bode, W. (1995). Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr Opin Structural Biol* 5, 383-390.
- Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A., and Goldberg, G. I. (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270, 5331-5338.
- Swerlick, R. A., Lee, K. H., Li, L. J., Sepp, N. T., Caughman, S. W., and Lawley, T. J. (1992). Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J Immunol* 149, 698-705.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., et al. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594.
- Taooka, Y., Chen, J., Yednock, T., and Sheppard, D. (1999). The integrin alpha9beta1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol* 145, 413-420.
- Teixido, J., Hemler, M. E., Greenberger, J. S., and Anklesaria, P. (1992). Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Invest* 90, 358-367.
- ter Brugge, P. J., Ta, V. B., de Bruijn, M. J., Keijzers, G., Maas, A., van Gent, D. C., and Hendriks, R. W. (2009). A mouse model for chronic lymphocytic leukemia based on expression of the SV40 large T antigen. *Blood* 114, 119-127.
- Ticchioni, M., Charvet, C., Noraz, N., Lamy, L., Steinberg, M., Bernard, A., and Deckert, M. (2002). Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* 99, 3111-3118.
- Ticchioni, M., Essafi, M., Jeandel, P. Y., Davi, F., Cassuto, J. P., Deckert, M., and Bernard, A. (2007). Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene* 26, 7081-7091.
- Till, K. J., Harris, R. J., Linford, A., Spiller, D. G., Zuzel, M., and Cawley, J. C. (2008). Cell motility in chronic lymphocytic leukemia: defective Rap1 and alphaLbeta2 activation by chemokine. *Cancer Res* 68, 8429-8436.

- Till, K. J., Lin, K., Zuzel, M., and Cawley, J. C. (2002). The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* 99, 2977-2984.
- Till, K. J., Spiller, D. G., Harris, R. J., Chen, H., Zuzel, M., and Cawley, J. C. (2005). CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood* 105, 4813-4819.
- Toth, M., Chvyrkova, I., Bernardo, M. M., Hernandez-Barrantes, S., and Fridman, R. (2003). Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 386-395.
- Trentin, L., Frasson, M., Donella-Deana, A., Frezzato, F., Pagano, M. A., Tibaldi, E., Gattazzo, C., Zambello, R., Semenzato, G., and Brunati, A. M. (2008). Geldanamycin-induced Lyn dissociation from aberrant Hsp90-stabilized cytosolic complex is an early event in apoptotic mechanisms in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 112, 4665-4674.
- Trocme, C., Gaudin, P., Berthier, S., Barro, C., Zaoui, P., and Morel, F. (1998). Human B lymphocytes synthesize the 92-kDa gelatinase, matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 273, 20677-20684.
- Tsiftoglou, A. S., Bonovolias, I. D., and Tsiftoglou, S. A. (2009). Multilevel targeting of hematopoietic stem cell self-renewal, differentiation and apoptosis for leukemia therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 122, 264-280.
- Uchiyama, H., Barut, B. A., Chauhan, D., Cannistra, S. A., and Anderson, K. C. (1992). Characterization of adhesion molecules on human myeloma cell lines. *Blood* 80, 2306-2314.
- Vacca, A., Ribatti, D., Presta, M., Minischetti, M., Iurlaro, M., Ria, R., Albini, A., Bussolino, F., and Dammacco, F. (1999). Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 93, 3064-3073.
- Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P. M., Dwek, R. A., and Opdenakker, G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37, 375-536.
- Van den Steen, P. E., Husson, S. J., Proost, P., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2003). Carboxyterminal cleavage of the chemokines MIG and IP-10 by gelatinase B and neutrophil collagenase. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 889-896.
- Van den Steen, P. E., Proost, P., Brand, D. D., Kang, A. H., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2004). Generation of glycosylated remnant epitopes from human collagen type II by gelatinase B. *Biochemistry* 43, 10809-10816.
- Van den Steen, P. E., Van Aelst, I., Hvidberg, V., Piccard, H., Fiten, P., Jacobsen, C., Moestrup, S. K., Fry, S., Royle, L., Wormald, M. R., *et al.* (2006). The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. *J Biol Chem* 281, 18626-18637.
- Veldurthy, A., Patz, M., Hagist, S., Pallasch, C. P., Wendtner, C. M., Hallek, M., and Krause, G. (2008). The kinase inhibitor dasatinib induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro with preference for a subgroup of patients with unmutated IgVH genes. *Blood* 112, 1443-1452.
- Verfaillie, C. M., McCarthy, J. B., and McGlave, P. B. (1992). Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV. *J Clin Invest* 90, 1232-1241.
- Vincent, A. M., Cawley, J. C., and Burthem, J. (1996). Integrin function in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 87, 4780-4788.
- Wang, L., Kurosaki, T., and Corey, S. J. (2007). Engagement of the B-cell antigen receptor activates STAT through Lyn in a Jak-independent pathway. *Oncogene* 26, 2851-2859.
- Westermarck, J., and Kahari, V. M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* 13, 781-792.
- Whitelock, J. M., Murdoch, A. D., Iozzo, R. V., and Underwood, P. A. (1996). The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem* 271, 10079-10086.

- Wojtowicz-Praga, S. M., Dickson, R. B., and Hawkins, M. J. (1997). Matrix metalloproteinase inhibitors. *Investigational New Drugs* 15, 61-75.
- Wright, N., Hidalgo, A., Rodriguez-Frade, J. M., Soriano, S. F., Mellado, M., Parmo-Cabanas, M., Briskin, M. J., and Teixido, J. (2002). The chemokine stromal cell-derived factor-1 alpha modulates alpha 4 beta 7 integrin-mediated lymphocyte adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and fibronectin. *J Immunol* 168, 5268-5277.
- Xin, H., Zhang, C., Herrmann, A., Du, Y., Figlin, R., and Yu, H. (2009). Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res* 69, 2506-2513.
- Yakubenko, V. P., Lobb, R. R., Plow, E. F., and Ugarova, T. P. (2000). Differential induction of gelatinase B (MMP-9) and gelatinase A (MMP-2) in T lymphocytes upon alpha(4)beta(1)-mediated adhesion to VCAM-1 and the CS-1 peptide of fibronectin. *Exp Cell Res* 260, 73-84.
- Yamaguchi, H., Pixley, F., and Condeelis, J. (2006). Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur J Cell Biol* 85, 213-218.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (1999). Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 13, 35-48.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14, 163-176.
- Zarcone, D., De Rossi, G., Tenca, C., Marroni, P., Mauro, F. R., Cerruti, G. M., Albi, N., Fiorucci, S., Velardi, A., and Grossi, C. E. (1998). Functional and clinical relevance of CD44 variant isoform expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 83, 1088-1098.
- Zlotnik, A. (2004). Chemokines in neoplastic progression. *Seminars in Cancer Biol* 14, 181-185.
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.
- Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D. R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.
- Zucchetto, A., Bomben, R., Dal Bo, M., Bulian, P., Benedetti, D., Nanni, P., Del Poeta, G., Degan, M., and Gattei, V. (2006). CD49d in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlated expression with CD38 and prognostic relevance. *Leukemia* 20, 523-525; author reply 528-529.

Lista de publicaciones

LISTA DE PUBLICACIONES

Redondo-Muñoz, J., Escobar-Díaz, E., Samaniego, R., Terol, M.J., García-Marco, J.A., and Garcia-Pardo, A. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is upregulated by $\alpha 4\beta 1$ integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. Blood. 2006 Nov 1; 108(9):3143-51.

Redondo-Muñoz, J., Terol, M.J., García-Marco, J.A., and Garcia-Pardo, A. Matrix metalloproteinase-9 is up-regulated by CCL21/CCR7 interaction via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling and is involved in CCL21-driven B-cell chronic lymphocytic leukemia cell invasion and migration. Blood. 2008 Jan 1; 111(1):383-6.

Redondo-Muñoz, J., Ugarte-Berzal E., García-Marco, J.A., Hernández del Cerro M., Van den Steen PE., Opdenakker G., Terol, M.J. and Garcia-Pardo, A. $\alpha 4\beta 1$ integrin and 190 kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. Blood. 2008 Jul 1; 112 (1):169-78. Comentario editorial en: Blood. 2008 Jul 1;112(1):5-6.

Ugarte-Berzal, E., **Redondo-Muñoz, J.**, Eroles P., Hernández del Cerro, M., García-Marco, J.A., Terol, M.J. and Garcia-Pardo, A. VEGF/VEGFR2 interaction downregulates matrix metalloproteinase-9 via STAT1 activation and inhibits B chronic lymphocytic leukemia cell migration. Blood, en prensa.

Redondo-Muñoz, J., Ugarte-Berzal E., Terol, M.J., Van den Steen PE., Hernández del Cerro M., Roderfeld M., Roeb E., Opdenakker G., García-Marco, J.A., and Garcia-Pardo, A. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) promotes chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through its hemopexin domain. Cancer Cell, en prensa.

Redondo-Muñoz, J*., Escobar-Díaz, E*., Hernández del Cerro, M., Pandiella, A., Terol, M.J., García-Marco, J.A., Angeles García-Pardo, A. Induction of B-chronic lymphocytic leukemia cell apoptosis by arsenic trioxide involves suppression of the PI3K/Akt survival pathway via JNK activation and PTEN upregulation. Enviado. *Igual contribución.

